

Ensamblaje *de novo* y anotación funcional *in silico* de las toxinas encontradas en la glándula de Duvernoy de *Pseudoboa nigr*a y *Xenodon guentheri*

Juan Sebastián Navarro González

Trabajo de Grado para Optar el Título de Biólogo

Tutor

Juan David Bayona Serrano

Biólogo

Cotutor

Hermínul de Jesús Cano calle

PhD en Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias puras

Escuela de Biología

Bucaramanga

2022

### **Agradecimientos**

Gracias al Laboratório Especial em Toxinologia Aplicada del Instituto Butantan de São Paulo, en especial al Doctor Inácio Junqueira de Azevedo por facilitarme los datos de la pasantía y permitirme el uso y manipulación de estos.

En especial a Juan David Bayona y el profe Herminul Cano que dirigieron mi pasantía e hicieron que se tornara de una forma agradable. Sin el conocimiento y la ayuda de ellos no hubiese culminado este proyecto.

Un sincero agradecimiento a Elson Meneses Pelayo y a Jeisson Gomez Robles que fueron los pioneros en darme a entender lo maravilloso que son los anfibios y reptiles. Gracias por adentrarme en el mundo de las serpientes y sus venenos, porque hoy en día puedo decir que la toxinología será mi ocupación a futuro.

Gracias a todos los profesores que hicieron parte de mi formación como persona y profesional. Gracias por brindarme las bases y los valores para emprender mi nuevo camino en este mundo de la biología.

Gracias a mi madre Paola González, quien desde pequeño me inculcó los valores y me enseñó a ser la persona que soy hoy en día. Gracias a ti, que sin importar los dolores de cabeza que te causaba por dejarme el transporte en el colegio mientras yo cogía renacuajos, siempre ibas a recogerme muy comprensiva. Gracias a ella quien me apoyó y fortaleció mentalmente durante toda la carrera. Gracias madre por darme la vida, te amo con todo mi corazón.

En especial a mi padre, Lucio Navarro por ser mi gran ejemplo a seguir, quien me inculcó la biología desde muy pequeño mientras muestreábamos ranas con Chucho. Gracias porque sin tu

ayuda y conocimientos mi carrera en biología hubiese sido diferente. Te amo enormemente padre mío.

Gracias a mis abuelas, Dora y Eneida quienes han sido mis segundas mamás y me han inculcado cosas buenas durante mi desarrollo como persona. Gracias nonas por enseñarme que la unión y el amor de familia es la base de la felicidad. Las amo demasiado.

En especial a mis abuelos, Luis Eduardo, a quien siempre me hubiese gustado conocer y, a Lucio Navarro quien me enseñó que la alegría era fundamental para la vida. Infinitas gracias porque a pesar de que ya no están vivos en algún momento de mi vida me han servido las lecciones que aprendí de ellos. Amados nonos siempre los llevare en mi corazón y serán el mayor orgullo de mi vida. Los amooo.

Un sincero agradecimiento a mi tía Kelly González, que siempre me ha enseñado que el respeto y la tolerancia son los valores mas importantes para vivir en comunidad. A Jesús, esposo de mi tia, porque siempre estuvo ahí en los momentos que mi computador lo necesitaba

Gracias a mi novia Marcela Rueda que desde que la conocí me ha llenado de felicidad y se ha convertido en uno de mis motores de vida. Gracias a doña Marta, don Jorge y Karol Rueda por convertirme en un integrante más de la familia y por todo el apoyo y el amor que me han brindado durante mis últimos años de carrera.

A Javier Arenas Pérez que me vio crecer desde muy pequeño y me enseñó que en esta vida todo se logra con esfuerzo.

Gracias a Jorge Parra, Brayán Castillo, Cristian Romero, Nicolas Camargo y Kevin Meza que fueron mis amigos, compañeros y hermanos de estudio. Esas traspasadas de cumbias nunca las olvidaré. También gracias a mis demás compañeros de carrera que en algún momento compartimos ratos de estudio y alegrías. A todos ustedes siempre los recordaré.

**Contenido**

	<b>Pág.</b>
Introducción .....	14
1. Objetivos.....	17
1.1 Objetivo general.....	17
1.2 Objetivos específicos .....	17
2. Competencias .....	18
3. Métodos.....	19
3.1 Procesamiento Previo de las Lecturas Brutas. ....	19
3.2 Ensamblaje del Transcriptoma.....	20
3.3 Identificación de las Toxinas .....	20
3.4 Transcritos Quiméricos.....	21
3.5 Perfil Composicional de la Glándula de Duvernoy .....	22
3.6. Alineamiento de Secuencias y Modelado de la Estructura Tridimensional de las Toxinas ..	23
4. Resultados.....	23
4.1 Ensamblaje del Transcriptoma.....	23
4.2 Anotación de las Toxinas.....	24
4.3 Transcritos Quiméricos.....	25
4.4 Composición de la Glándula de Duvernoy .....	26

4.5 Niveles de expresión de los componentes encontrados en la glándula de Duvernoy de <i>P. nigra</i> y <i>X. guentheri</i> .....	28
4.5.1 Niveles de Expresión de los Componentes Encontrados en la Glándula de Duvernoy de <i>P. nigra</i> .....	30
4.5.1.1 Individuo 1.....	30
4.5.1.2 Individuo 2.....	32
4.5.1.3 Individuo 3.....	34
4.5.2 Niveles de Expresión de los Componentes encontrados en la Glándula de Duvernoy de <i>X. guentheri</i> .....	36
4.5.2.1 Individuo 1.....	36
4.5.2.2 Individuo 2.....	38
4.5.2.3 Individuo 3.....	40
5. Discusión.....	42
5.1 Ensamblaje del Transcriptoma.....	42
5.2 Componentes Tóxicos.....	42
5.2.1 Metaloproteinasas de Veneno de Serpiente (SVMPs).....	43
5.2.2 Fosfolipasas A2 (PLA2s).....	47
5.2.3 Lectinas Tipo C (CTLs).....	51
5.2.4 Precursor de Péptidos Natriuréticos Tipo C (CNP).....	55
5.2.5 Proteínas Secretoras ricas en Cisteína (CRISPs) .....	57
5.2.6 Serinoproteinasas de Veneno de Serpiente (SVSPs) .....	60
5.2.7 Toxinas de 3 Dedos (3FTxs).....	62
5.2.8 Metaloproteinasas de Matriz (MMPs) como Novedad en los Venenos de Serpiente.....	64

<b>ENSAMBLAJE Y ANOTACIÓN FUNCIONAL DE TOXINAS</b>	<b>6</b>
5.2.9 Otras Toxinas de Baja Abundancia.....	70
5.3 Variación en la Composición de los Venenos de Serpiente .....	70
5.3.1 Variación Interespecífica entre <i>P. nigra</i> y <i>X. guentheri</i> .....	71
5.3.2 Variación Intraespecífica en <i>P. nigra</i> .....	72
5.3.3 Variación Intraespecífica en <i>X. guentheri</i> .....	73
5.4 Posibles Efectos Fisiopatológicos del Veneno de <i>P. nigra</i> y <i>X. guentheri</i> .....	74
6. Conclusiones .....	76
Referencias Bibliográficas .....	78
Apéndices.....	104

## Lista de Tablas

Pág.

Tabla 1. <i>Compleitud del transcriptoma de la glándula de Duvernoy de P. nigra y X. guentheri</i>	24
Tabla 2. <i>Número de Toxinas Curadas por Individuo después de la Anotación</i> .....	25
Tabla 3. <i>Familias de Toxinas Reportadas para cada uno de los Individuos de P. nigra y X. guentheri</i> .....	26
Tabla 4. <i>Isoformas de CTLs</i> .....	53

## Lista de Figuras

	<b>Pág.</b>
Figura 1. <i>Perfil de expresión génica de la glándula de Duvernoy de P. nigra y X. guentheri</i> .....	29
Figura 2. <i>Perfil composicional de la Glándula de Duvernoy del Individuo 1 de P. nigra</i> .....	31
Figura 3. <i>Perfil Composicional de la Glándula de Duvernoy del Individuo 2 de P. nigra</i> .....	33
Figura 4. <i>Perfil Composicional de la Glándula de Duvernoy del Individuo 3 de P. nigra</i> .....	35
Figura 5. <i>Perfil Composicional de la Glándula de Duvernoy del Individuo 1 de X. guentheri</i> ...	37
Figura 6. <i>Perfil Composicional de la Glándula de Duvernoy del Individuo 2 de X. guentheri</i> ...	39
Figura 7. <i>Perfil Composicional de la Glándula de Duvernoy del Individuo 3 de X. guentheri</i> ...	41
Figura 8. <i>Dominios Estructurales de las SVMPS</i> .....	45
Figura 9. <i>Dominios Estructurales de las PLA2s</i> .....	49
Figura 10. <i>Dominios Estructurales de las CTLs</i> .....	53
Figura 11. <i>Estructura del Precursor de CNPs</i> .....	57
Figura 12. <i>Dominios Estructurales de las CRISPs</i> .....	59
Figura 13. <i>Estructura 3D de las SVSPs</i> .....	61
Figura 14. <i>Estructura 3D de las 3FTxs</i> .....	63
Figura 15. <i>Dominios Estructurales de las MMPs</i> .....	67
Figura 16. <i>Modelo Evolutivo de las SVMPS y MMPs</i> .....	69

Lista de Apéndices

Pág.

Apéndice A. Datos de los Individuos ..... 104

Apéndice B. Perfiles de cobertura ..... 105

**Glosario**

- 3FTx: Toxina de 3 dedos
- 5NUCL: Nucleotidasa 5'
- ACES: Acetilcolinesterasa
- CNP: Péptido natriurético tipo C
- CRISP: Proteína secretora rica en cisteína
- CTL: Lectina tipo C
- CYS: Cistatinas
- DIESTER: Diesterasa
- DIPEP: Dipeptidil peptidasa
- FAXV: Factor X de coagulación de veneno
- HYAL: Hialuronidasa
- IPLA2: Inhibidor de Fosfolipasa A2
- KUNZ: Proteínas tipo kunitz
- KUWAP: Proteína fusionada KUnitz-WAPrina
- MMP: Metaloproteinasa de matriz
- OHAN: Ohanina
- PLA2-I: Fosfolipasa A2 tipo I
- PLA2-II: Fosfolipasa A2 tipo II
- PLA2: Fosfolipasa A2
- PLB: Fosfolipasa B

- seMMP-9: Metaloproteínasa de matriz endógena de serpiente tipo 9
- SVLIPA: Lipasa ácida de veneno de serpiente
- svMMP-A: Metaloproteínasa de matriz de veneno de serpiente tipo A
- SVMP: Metaloproteínasa de veneno de serpiente
- SVSP: Serinoproteínasa de veneno de serpiente
- VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial
- WAP: Proteína tipo Waprina

**Resumen**

**Título:** Ensamblaje *de novo* y anotación funcional *in silico* de las toxinas encontradas en la glándula de Duvernoy de *Pseudoboa nigra* y *Xenodon guentheri*.\*

**Autor:** Juan Sebastián Navarro González\*\*

**Palabras Clave:** Colúbrido, *Pseudoboa nigra*, *Xenodon guentheri*, Veneno de serpiente, Glándula de Duvernoy, Transcriptoma, Secuenciación transcriptómica

**Descripción:** Mas de 10 décadas de estudios bioquímicos y farmacológicos han proporcionado gran información sobre los venenos de serpientes. Antiguamente, estos estudios caracterizaban los venenos mediante enfoques de primera generación como la química de proteínas, la farmacología comparativa y los métodos cladísticos. Sin embargo, en la actualidad la secuenciación transcriptómica (RNAseq) y la secuenciación genómica han permitido reportar un amplio espectro de familias presentes en los venenos de serpientes. Debido a que la mayoría de toxinas que se han reportado ha sido a partir de venenos de las familias Viperidae, Elapidae y Atractaspidae (familias de importancia medica); los venenos de colúbridos aún siguen presentando un vacío de conocimiento sobre su diversidad de toxinas. En esta pasantía se ensamblaron *de novo* los transcriptomas de la glándula de Duvernoy de *Pseudoboa nigra* y *Xenodon guentheri* (Dipsadidae: Xenodontinae) aplicando un enfoque híbrido, utilizando Trinity, rnaSPADES y Extender. Identificamos un total de 23 familias de toxinas siendo las SVMPs, CRISPs y CTLs las que predominaban en los venenos de estas dos especies. Además, identificamos dos familias de toxinas novedosas (MMPs y PLA2s-IIIE) que ya habían sido reportadas anteriormente en algunas especies de colúbridos pero que carecen de una caracterización completa. Los niveles de expresión indican que existe una variación intra e interespecífica entre *P. nigra* y *X. guentheri* como se había reportado previamente para vipéridos y elápidos. En conclusión, presentamos información inédita sobre la diversidad de toxinas en dos especies de colúbridos y la comparamos con datos funcionales disponibles en la literatura para inferir los posibles efectos causados por la mordedura de estas especies.

---

\* Trabajo de Grado

\*\*Facultad de Biología, Escuela de Biología. Tutor: Juan David Bayona Serrano, Biólogo. Cotutor: Herminul de Jesús Cano Calle, Ph.D.

**Abstract**

**Title:** *De novo* assembly and *in silico* functional annotation of toxins found in the Duvernoy's gland of *Pseudoboa nigra* and *Xenodon guentheri*.\*

**Author:** Juan Sebastián Navarro González\*\*

**Key Words:** Colubrid, *Pseudoboa nigra*, *Xenodon guentheri*, Snake venom, Duvernoy's gland, Transcriptome, Transcriptomic sequencing

**Description:** More than 10 decades of biochemical and pharmacological studies have provided great information on snake venom. In the past, these studies characterized venoms using first-generation approaches such as protein chemistry, comparative pharmacology, and cladistic methods. However, modern transcriptomic (RNAseq) and genomic sequencing have made it possible to report a wide spectrum of protein families present in snake venoms. Because most of the toxins that have been reported belong to venoms of the families Viperidae, Elapidae and Atractaspidae (families of medical importance); data about the toxin diversity of colubrid venoms is greatly neglected. In this internship, the Duvernoy's gland transcriptomes of *Pseudoboa nigra* and *Xenodon guentheri* (Dipsadidae: Xenodontinae) were *de novo* assembled applying a hybrid approach, using Trinity, rnaSPADES and Extender. We identified a total of 23 families of toxins, being the SVMPs, CRISPs and CTLs the ones that predominated in the venoms of these two species. In addition, we identified two families of novel toxins (MMPs and PLA2s-IIIE) that had been previously reported in some colubrid species but that lack complete characterization. The expression levels indicate that there is an intra and interspecific variation between *P. nigra* and *X. guentheri* as previously reported for viperids and elapids. In conclusion, we present unpublished information on the diversity of toxins in two species of colubrids and compare it with functional data available in the literature to infer the possible effects caused by the bite of these species.

---

\* Degree Work

\*\*Biology Faculty, Biology School. Tutor: Juan David Bayona Serrano, Biologist. Co-tutor: Herminul de Jesús Cano Calle, Ph.D.

## Introducción

Más de 10 décadas de estudios bioquímicos y farmacológicos han proporcionado gran información sobre los venenos de serpiente (Junqueira-de-Azevedo et al., 2016; Mackessy et al., 2021; Prezotto-Neto et al., 2016; Torres-Bonilla et al., 2016). Estos estudios se han limitado a caracterizarlos composicionalmente mediante enfoques de primera generación que incluyen la química de proteínas, la farmacología comparativa y los métodos cladísticos (Junqueira-de-Azevedo et al., 2016). Recientemente, los avances en biología molecular, precisamente en las técnicas de secuenciación de proteínas y ácidos nucleicos, han ampliado en gran escala la comprensión de la complejidad de los venenos de serpiente (Junqueira-de-Azevedo et al., 2016). Técnicas recientes de nueva generación, como la secuenciación transcriptómica (RNAseq) y la secuenciación genómica (Brahma et al., 2015; Calvete, 2013; Ducancel et al., 2014) han acelerado la obtención de secuencias y análisis de composición, constituyendo la base de iniciativas de exploración biotecnológica a gran escala (Gilles y Servent, 2014). Gracias a estos avances se han registrado un amplio espectro de familias y superfamilias de toxinas presentes en los venenos de serpientes de colmillos frontales (vipéridos, elápidos y atractápidos) que representan un riesgo significativo para la salud humana (Aird et al., 2013; Margres et al., 2014; Modahl et al., 2015; Terrat et al., 2013; Viala et al., 2015). Sin embargo, actualmente hay un vacío de conocimiento sobre una gran parte de la diversidad de serpientes productoras de veneno de baja letalidad para los humanos (Modahl et al., 2015).

Las serpientes avanzadas pertenecen al clado Caenophidia que agrupa a las especies que desarrollaron un sistema de producción e inoculación de veneno (Uetz, 2010, Zaher et al. 2019).

Dentro de este grupo encontramos a la familia Colubridae, que anteriormente contenía a toda serpiente que no pertenecía a ninguna de las tres familias de relevancia médica (Viperidae, Elapidae y Atractaspididae) (Heise et al., 1995; Kelly et al., 2003; Kraus y Brown, 1998). Esta familia, a pesar de ser reconocida como un grupo parafilético, mantuvo su consenso sistemático durante muchos años (Heise et al., 1995; Kelly et al., 2003). Recientemente, las relaciones filogenéticas de la familia Colubridae han sido revisadas por varios autores, existiendo dos propuestas generales para ordenar sus relaciones internas. La primera propuesta mantiene a Colubridae como una familia que contiene a las subfamilias Dipsadinae, Natricinae, Colubrinae, Pseudoxenodontinae, Scaphiodontophiinae, Calamariinae y Grayiinae (Pyron et al., 2011; Pyron et al., 2013; Vidal et al., 2007). Por otro lado, algunos autores consideran a Natricidae y Dipsadidae como familias independientes (Uetz, 2010; Zaher et al., 2019). Debido a esto, el término “colúbrido” es taxonómicamente confuso y conviene delimitarlo de forma clara. En esta pasantía, usaremos el término “colúbrido” para referirnos a la familia propuesta por Pyron et al. (2013).

Dentro de este grupo de serpientes encontramos especies que poseen un par de colmillos traseros agrandados (dentición opistoglifa) que se asocian típicamente con las glándulas de Duvernoy, homólogas de las glándulas de veneno de las familias Viperidae y Elapidae (Saviola et al., 2014; Weinstein et al., 2009). Los venenos de serpientes opistoglifas han sido poco estudiados debido a su menor capacidad para inyectar dosis letales en los seres humanos, siendo poco los estudios que aportan al conocimiento del repertorio de toxinas de esta familia. Esta falta de información disponible dificulta predecir el número de posibles nuevos tipos de proteínas crípticas que estos poseen (Bayona-Serrano et al. 2020; Junqueira-de-Azevedo et al., 2016; Modahl et al., 2015). Por otra parte, debido a que no hay un genoma de referencia para la mayoría de especies de colúbridos, el ensamblaje del transcriptoma y la anotación de toxinas de la glándula de Duvernoy

de estas especies es complicado y requiere la utilización de softwares que ensamblen de novo los transcritos de toxinas encontrados (Bayona-Serrano et al., 2020; Junqueira-de-Azevedo et al., 2016; Rokyta et al., 2012). Trinity es el ensamblador más eficiente desde el punto de vista computacional, sin embargo, se ha descubierto que no es tan eficaz al ensamblar secuencias codificantes completas de toxinas y que genera secuencias quiméricas (Archer et al. 2014). Extender, por otro lado, fue diseñado para generar transcritos más largos y completos, pero tiende a ensamblar solo transcritos altamente expresados (Rokyta et al., 2012). Finalmente, rnaSPAdes consigue ensamblar un número relativamente alto del total de genes esperados (50%-95%) pero al mismo tiempo presenta errores de ensamblaje y una tasa de duplicación en niveles moderados (Bushmanova et al., 2018). Además, la tendencia de los genes de toxinas a presentar varios parálogos en tándem, dificulta aún más la correcta determinación de las toxinas que están siendo expresadas en la glándula de Duvernoy de especies de colúbridos (Almeida et al., 2021).

En esta pasantía se ensamblaron *de novo* los transcriptomas de la glándula de Duvernoy de *Pseudoboa nigra* y *Xenodon guentheri* (Dipsadidae: Xenodontinae), con base en un enfoque híbrido, utilizando Trinity, rnaSPADES y Extender. Además, se realizó un análisis de expresión para cuantificar la proporción de las diferentes familias de toxinas que se encuentran en la glándula de Duvernoy de las dos especies. Por ende, con los resultados de esta pasantía se pretende proporcionar un incremento de la cantidad de datos disponibles sobre las toxinas de este grupo de serpientes poco estudiado.

## 1. Objetivos

### 1.1 Objetivo General

Caracterizar las toxinas encontradas en el transcriptoma de la glándula de Duvernoy de *Pseudoboa nigra* y *Xenodon guentheri*.

### 1.2 Objetivos Específicos

Preprocesar las lecturas brutas obtenidas de la secuenciación Illumina™ de las librerías de cDNA construidas a partir del RNA total extraído de la glándula de veneno de individuos de *P. nigra* y *X. guentheri*.

Ensamblar de novo los transcriptomas de las glándulas de veneno de individuos de *P. nigra* y *X. guentheri*.

Identificar las toxinas presentes en las glándulas de veneno de individuos de *P. nigra* y *X. guentheri* mediante curación y revisión manual.

Determinar la presencia de transcritos quiméricos mediante un análisis de cobertura.

Obtener un perfil composicional de los transcritos presentes en las glándulas de Duvernoy de las serpientes *P. nigra* y *X. guentheri*.

## 2. Competencias

Entender las bases metodológicas de un análisis de RNA-seq desde la extracción de las muestras, la tecnología de secuenciación, el procesamiento previo de las lecturas obtenidas y los algoritmos de ensamblaje *de novo* de los transcritos.

Familiarizarse con los diferentes softwares (1) de edición de datos transcriptómicos, (2) de ensamblaje *de novo* y (3) de cálculo de expresión génica.

Comprender los diferentes métodos para calcular la expresión de datos obtenidos con Secuenciación de Nueva Generación (NGS) y aplicar estas herramientas para describir la composición de los transcriptomas de las especies estudiadas.

Conseguir identificar la presencia de artefactos de ensamblaje como transcritos quiméricos realizando un análisis de cobertura.

Aprender a realizar el proceso de revisión y curación manual de las diferentes toxinas, demostrando conocimiento estructural sobre los diferentes tipos de dominios proteicos presentes en cada una de ellas.

### 3. Métodos

#### 3.1 Procesamiento Previo de las Lecturas Brutas.

Se utilizaron lecturas Illumina™ pareadas obtenidas de librerías de cDNA construidas a partir del RNA total separado de la glándula de veneno de 3 individuos de *P. nigra* y 3 individuos de *X. guentheri* de Brasil (Apéndice A). Estas lecturas fueron obtenidas dentro del marco del proyecto “Análises venômicas de serpentes Dipsadidae focando em adaptações à ofiofagia.” (Proceso número 2017/24498-9 de la Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP) que se está llevando a cabo en el Laboratorio Especial de Toxicología Aplicada (LETA) del Instituto Butantan. Para determinar la existencia de contaminación cruzada entre las lecturas de las muestras sin procesar que pasaron el filtro de calidad de Illumina se utilizó un script personalizado de python que utiliza los software Jellyfish (Marçais y Kingsford, 2011) y k-mer Analysis Toolkit (Mapleson et al., 2016) como base, teniendo en cuenta dos parámetros: 1) k-mers que en una muestra X tuvo conteos mayores a 1000 fueron considerados como posibles contaminantes para otras muestras Y y 2) k-mers con conteos menores a  $\frac{k\text{-mer con } > \text{frecuencia}}{1000}$  en una muestra Y que coincidieron con los determinados para otra muestra X en el parámetro anterior fueron considerados contaminantes dentro de la muestra Y (Bayona-Serrano et al. 2020). Las lecturas de extremos pareados de 150 pb sin procesar se recortaron para remover los adaptadores de secuenciamiento y mantener sólo las que poseían una longitud superior a 75 pb y las que contaran con un score PHRED de determinación de bases igual o superior a 5 utilizando Trim Galore v. 0.6.6 (Krueger, 2015). Se utilizó Fastqc (<https://github.com/csf-ngs/fastqc>) para confirmar la calidad de las lecturas debido a la tendencia observada en Illumina™ a disminuir la

confiabilidad de la secuencia en los extremos 3' (Zhang et al. 2014). Finalmente, las lecturas que pasaron el filtro de calidad se fusionaron sobre la base de sus superposiciones en sus extremos 3' empleando el software PEAR v. 0.9.6 con parámetros por defecto (Rokyta et al. 2012; Zhang et al. 2014).

### 3.2 Ensamblaje del Transcriptoma

Para ensamblar los transcritos de toxinas de las glándulas del veneno, se utilizaron tres ensambladores *de novo* diferentes: **1)** Trinity v. 2.8.5 (Grabherr et al. 2011), con una longitud de k-mer de 31; **2)** Extender v. 1.0 (Rokyta et al. 2012) utilizó 1000 lecturas combinadas como semillas, extendiendo las semillas en función de superposiciones exactas de 120 pares de bases; y **3)** rnaSPAdes v. 3.14.1 (Bushmanova et al., 2018), con una longitud de k-mer de 75. Mediante el uso de estos tres programas, aprovechamos las ventajas de cada uno para generar un conjunto de datos de secuencias más completo concatenado en un archivo final. La completitud del ensamblaje del transcriptoma de cada uno de los 6 individuos se evaluó mediante búsquedas BUSCO\_v5 (Seppey et al., 2019), ejecutado en gVolante2 (Nishimura et al., 2019), utilizando un conjunto de 233 genes centrales de vertebrados (Shibata et al., 2018).

### 3.3 Identificación de las Toxinas

Para la anotación de las toxinas se combinaron los resultados de los tres ensambladores empleados y se utilizó el script ToxinHunter (<https://github.com/gebarros/ToxinHunter>). ToxinHunter implementa dos algoritmos de BLAST de la siguiente manera: **1)** realiza un alineamiento con el algoritmo de tblastn de 381 toxinas de referencia contra los transcritos previamente ensamblados. Los transcritos con una cobertura mayor o igual al 90% son

seleccionados, llevando a cabo posteriormente la predicción de sus respectivos marcos abiertos de lectura utilizando TransDecoder v. 5.5.0 (<https://github.com/TransDecoder/TransDecoder>); y **2**) luego utiliza el algoritmo de blastp para alinear los marcos abiertos de lectura de los transcritos seleccionados contra las toxinas de referencia. Por último, ToxinHunter realiza un filtrado y una anotación de los marcos abiertos de lectura, eliminando redundancias y generando 4 archivos de salida: **a**) secuencias aminoacídicas con una cobertura  $\geq 90\%$  y una identidad  $\geq 50\%$  contra las toxinas del banco de datos; **b**) secuencias nucleotídicas con una cobertura  $\geq 90\%$  y una identidad  $\geq 50\%$  contra las toxinas del banco de datos; **c**) secuencias aminoacídicas con una cobertura  $\geq 90\%$  y una identidad  $\leq 50\%$  contra las toxinas del banco de datos; y **d**) secuencias aminoacídicas con una cobertura entre el 50% y el 89.99% y una identidad  $\geq 50\%$  contra las toxinas del banco de datos. La revisión de cada transcrito anotado se realizó de forma manual mediante búsquedas blastx y blastn (Altschul et al., 1990) con un valor de corte e-value de  $1e^{-6}$ . Esta revisión se realizó para identificar el marco abierto de lectura correcto que contenía los dominios esperados para cada clase de toxina anotada. Sumado a esto, se revisó también la existencia de péptido señal para cada transcrito implementando la plataforma de SignalP v5.0 (Almagro Armenteros et al., 2019).

### 3.4 Transcritos Quiméricos

La detección de secuencias quiméricas se llevó a cabo usando el script chimerakiller v. 0.7.4 (<https://github.com/masonaj157/ChimeraKiller>) con el cual se analizó la distribución de las lecturas para cada posición del transcrito, y se consideró un transcrito quimérico cuando las lecturas tenían un sesgo distribucional mayor al 75% hacia uno de los dos lados para cada posición (Krueger, 2015). Como control, los transcritos con cobertura cero en cualquier posición se marcaron y eliminaron automáticamente. Por último, el conjunto de datos de transcritos finales de

cada uno de los individuos, que pasaron el filtro de cobertura, se agrupó usando CD-HIT (Fu et al. 2012 ) con un umbral de identidad del 99%, manteniendo siempre los transcritos más largos.

### 3.5 Perfil Composicional de la Glándula de Duvernoy

Para determinar el perfil composicional de la glándula de Duvernoy de cada individuo se creó un archivo que incluye el total de transcritos no tóxicos ensamblados con Trinity y el conjunto de toxinas final que se generó usando CD-HIT. Para generar este archivo, se tomó el ensamblaje *de novo* del transcriptoma hecho con Trinity y se hizo una búsqueda blastn contra el conjunto de toxinas final generado por CD-HIT, con los siguientes parámetros: un E-value de  $1e^{-5}$  un puntaje (Match – Mismatch) de 2 a 3 y un costo del GAP de 52 (Bayona-Serrano et al., 2020). Posteriormente, los transcritos ensamblados con Trinity que se alinearon con el conjunto de toxinas final se removieron y el conjunto de transcritos restantes (transcritos no tóxicos) se concatenó con el conjunto de toxinas finales, para generar un archivo del transcriptoma total de la glándula de Duvernoy de cada individuo. Finalmente, este archivo se usó para determinar el nivel de expresión del total de transcritos ensamblados para cada individuo, utilizando el software RSEM v. 1.3.3(Li y Dewey, 2011), mapeando las lecturas de cada muestra usando bowtie2, como ha sido descrito previamente (Bayona-Serrano et al., 2020). Los resultados se expresaron en Transcritos Por Millón (TPM), se tabularon y fueron representados con un color rojo cuya intensidad fue directamente proporcional al  $TPM \times \log$ . Además, se realizaron gráficos comparativos para mostrar una disparidad de las toxinas presentes o ausentes en la glándula de veneno de cada una de las especies estudiadas.

### 3.6. Alineamiento de Secuencias y Modelado de la Estructura Tridimensional de las Toxinas

Para obtener los alineamientos y la estructura tridimensional de las toxinas en esta pasantía, primero fue necesario traducir las secuencias nucleotídicas implementando el servidor DNA to protein translation (<http://insilico.ehu.es/translate/>). Seguido a esto, las secuencias aminoacídicas se alinearon implementando el servidor de Clustal Omega y se utilizaron para predecir el modelo estructural usando el servidor SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) (Madeira et al., 2019; Waterhouse et al., 2018). Por último, se descargaron los modelos en formato .pdb y se visualizaron y editaron en el programa PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, v 2.5, Schrödinger, LLC).

## 4. Resultados

### 4.1 Ensamblaje del Transcriptoma

Se realizó el ensamblaje del transcriptoma de la glándula de Duvernoy de 3 individuos de *P. nigra* y 3 de *X. guentheri*. Para cada uno de los individuos se utilizó un enfoque híbrido, el cual implicó un ensamblaje previo de las lecturas de Illumina™ con Trinity, maSPAdes y Extender, seguido de la concatenación de los resultados de estos 3 ensambladores en un transcriptoma final combinado. El ensamblaje del transcriptoma final combinado de cada uno de los individuos tuvo tamaños variables con diferentes números de transcritos ensamblados (Tabla 1). Además, los valores de N50 y L50, el contenido de G + C y el número de genes recuperados con respecto a los genes consultados también arrojaron valores variables (Tabla 1).

Tabla 1.

Complejidad del Transcriptoma de la Glándula de Duvernoy de *P. nigra* y *X. guentheri*

	<i>P. nigra</i>			<i>X. guentheri</i>		
	Ind. 1	Ind. 2	Ind. 3	Ind. 1	Ind. 2	Ind. 3
Número total de genes centrales consultados	233	233	233	233	233	233
Número de genes centrales completos	153 (65.67%)	174 (74.68%)	198 (84.98%)	161 (69.10%)	147 (63.09%)	146 (62.66%)
Número de genes centrales completos + parciales	186 (79.83%)	192 (82.40%)	207 (88.84%)	185 (79.40%)	184 (78.97%)	175 (75.11%)
Número de genes centrales faltantes	47 (20.17%)	41 (17.60%)	26 (11.16%)	48 (20.60%)	49 (21.03%)	58 (24.89%)
Ensamblaje total del transcriptoma (nt)	166,372,994	249,705,621	334,432,395	212,780,257	182,018,737	175,769,336
Transcritos	173,464	247,781	313,915	216,516	171,779	168,551
Transcrito más largo (nt)	11,924	20,063	16,947	11,554	9,732	9,801
Transcrito más corto (nt)	150	201	164	162	160	160
Transcrito N50 (nt)	1,404	1,559	1,736	1,451	1,558	1,527
Transcrito L50	35,651	48,727	57,962	44,472	35,566	34,901
Contenido de G+C (%)	45.11	44.22	43.76	43.28	43.31	43.31

*Nota.* Evaluación de la completitud del transcriptoma de la glándula de Duvernoy de cada uno de los individuos de *P. nigra* y *X. guentheri* por medio de BUSCO v5. Número de genes recuperados de 233 genes centrales de vertebrados consultados; longitud del transcriptoma. Número de transcritos ensamblados. N50(nt): longitud del transcrito más corto necesario para ensamblar el 50% del transcriptoma total. L50: número de transcritos necesarios para ensamblar el 50% del transcriptoma total.

#### 4.2 Anotación de las Toxinas

Los datos transcriptómicos ensamblados se utilizaron para la anotación funcional de las toxinas presentes en la glándula de Duvernoy de los 6 individuos. Realizando un alineamiento de los transcritos ensamblados contra una base de datos de 381 toxinas y haciendo un filtrado por cobertura  $\geq 90\%$  e identidad  $\geq 50\%$ , empleando ToxinHunter (Barros, 2019), se anotaron 532, 315 y 372 toxinas para los individuos 1, 2 y 3 de *P. nigra*, respectivamente (Tabla 2). El número de toxinas anotadas para los individuos 1, 2 y 3 de *X. guentheri* fue de 335, 213 y 277, respectivamente (Tabla 2). La curación manual excluyó el 5.64%, 4.44% y 9.40% de las toxinas

anotadas para los individuos 1, 2 y 3 de *P. nigra*, y el 8.66%, 10.33% y 6.49% de las toxinas anotadas para los individuos 1, 2 y 3 de *X. guentheri*. Las toxinas restantes fueron tenidas en cuenta para el análisis de cobertura y de expresión génica (Tabla 2).

**Tabla 2.**

*Número de Toxinas Curadas por Individuo después de la Anotación*

Especie	Individuos	# Toxinas sin curar	# Toxinas curadas
<i>P. nigra</i>	1	532	502
	2	315	301
	3	372	337
<i>X. guentheri</i>	1	335	306
	2	213	191
	3	277	259

### 4.3 Transcritos Quiméricos

Para la detección de transcritos quiméricos se realizó un análisis de cobertura, en el cual se mapearon las lecturas Illumina™ contra las toxinas previamente curadas y se excluyeron los transcritos que tuvieron irregularidades en el perfil de cobertura esperadas en transcritos quiméricos (Kerkvliet et al., 2019). Como resultado del análisis de cobertura y de la agrupación usando CD-HIT (Fu et al. 2012) se excluyeron 470, 274 y 310 transcritos del número total de transcritos curados para los individuos 1, 2 y 3 de *P. nigra*, respectivamente. En cuanto a los individuos 1, 2 y 3 de *X. guentheri*, se excluyeron 272, 155 y 223 transcritos del total de transcritos curados para esta especie, respectivamente. El conjunto de datos de transcritos finales de los individuos 1, 2 y 3 de *P. nigra* se compuso de 32, 27 y 27 transcritos, respectivamente; a diferencia del conjunto de datos de *X. guentheri* que se compuso de 34, 36 y 26 transcritos para los individuos

1, 2 y 3, respectivamente. Por último, el conjunto de transcritos finales se ordenó y se clasificó en un total de 23 familias siguiendo la anotación inicial de ToxinHunter (Tabla 3).

**Tabla 3.**

*Familias de Toxinas Reportadas para cada uno de los Individuos de P. nigra y X. guentheri*

Familia	<i>P. nigra</i>			<i>X. guentheri</i>		
	Ind 1	Ind 2	Ind 3	Ind 1	Ind 2	Ind 3
SVMP	X	X	X	X	X	X
CTL	X	X	X	X	X	X
CRISP	X		X		X	X
CNP	X	X	X			X
PLA2	X	X	X			
3FTx				X	X	X
SVSP				X	X	X
KUNZ		X				
MMP	X	X	X	X	X	X
PLB	X	X	X	X	X	X
OHAN		X		X		X
SVLIPA		X	X		X	X
VEGF	X		X	X		X
HYAL	X		X	X	X	X
FAXV	X	X	X	X	X	X
DIESTER					X	X
WAP	X	X	X	X	X	X
DIPEP	X				X	
ACES					X	
CYS	X	X		X	X	
5NUCL			X			
KUWAP	X					
IPLA2				X	X	X

*Nota.* Las “X” debajo de cada individuo representa la presencia de las diferentes familias de toxinas encontradas en sus glándulas de Duvernoy.

#### 4.4 Composición de la Glándula de Duvernoy

El total de familias de toxinas que se encontraron en la glándula de Duvernoy de los individuos en estudio de esta pasantía se dividió en dos grupos según Junqueira-de-Azevedo et al.

(2016): 1) Componentes principales de los venenos de serpiente, haciendo referencia a proteínas que se encuentran generalmente en grandes cantidades en los venenos de serpientes tradicionalmente venenosas (Vipéridos y Elápidos) (Mackessy et al., 2021) (Figura 1A); y 2) Componentes de menor ocurrencia del veneno de serpiente indicando los tipos de proteínas descritos en el veneno de algunas especies de serpientes venenosas, pero generalmente en bajas cantidades y que pueden representar toxinas nuevas, proteínas secundarias del veneno o proteínas constitutivas (Junqueira-de-Azevedo et al., 2016) (Figura 1B). Adicionalmente, las toxinas también se clasificaron como enzimáticas y no enzimáticas en cada uno de los 2 grupos (Figura 1).

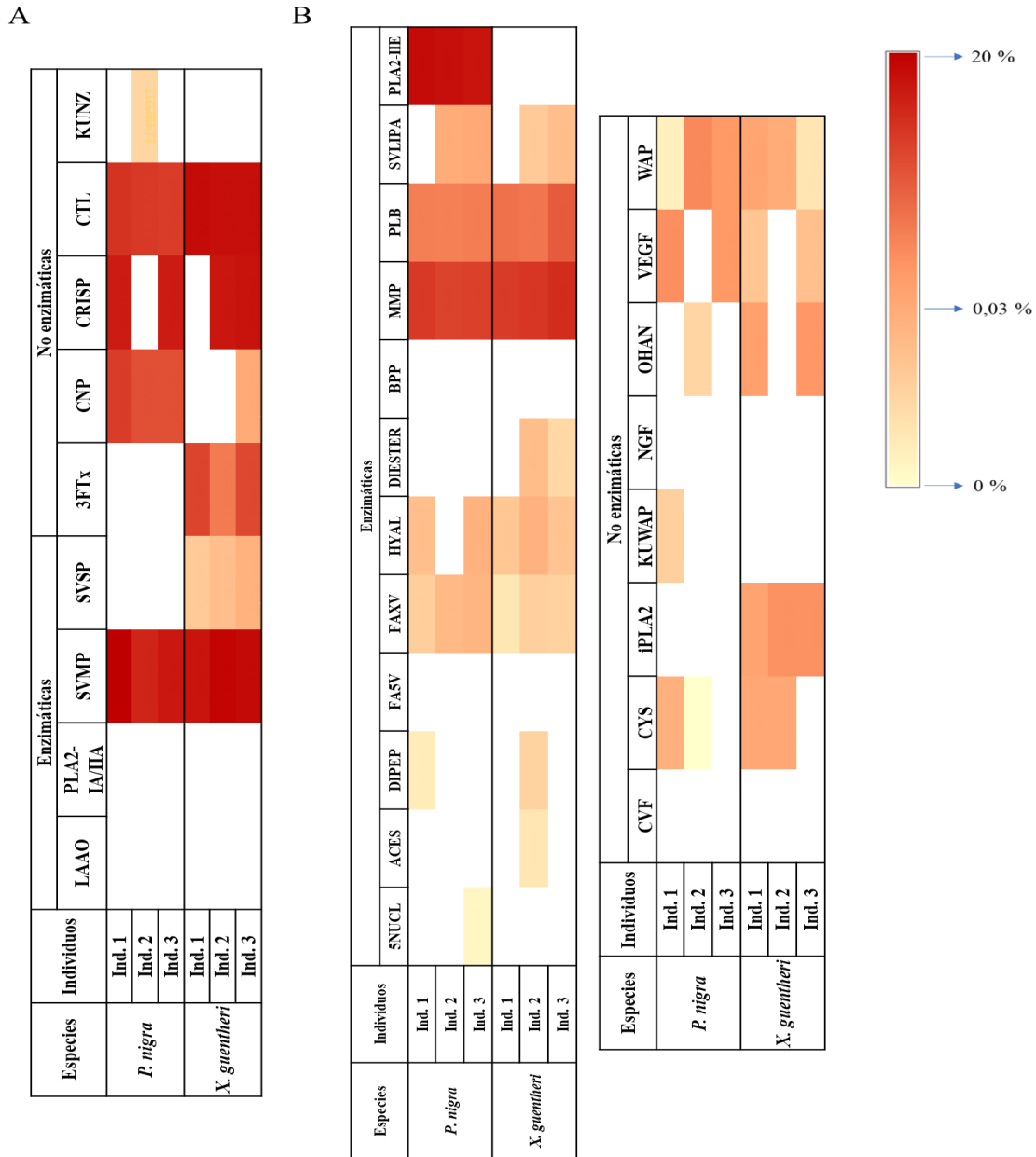
Se reportaron 8 familias de toxinas principales, distribuidas entre los 6 individuos de esta pasantía, apreciando la ausencia de LAAOs, PLA2s-IA y PLA2s-IIA en las dos especies. La glándula de Duvernoy de *P. nigra* se compuso principalmente de SVMPS, CTLs, CRISPs, CNPs, KUNZs y PLA2s (PLA2s-IIIE); mientras que los componentes principales de *X. guentheri* fueron las SVMPS, CTLs, CRISPs, CNPs, 3FTxs y SVSPs. Por el contrario, se reportaron 15 toxinas de baja ocurrencia distribuidas entre los individuos de estas dos especies. Se encontraron MMPs, PLBs, OHANs, SVLIPAs, VEGFs, HYALs, FAXVs, WAPs, DIPEPs, CYSS, 5NUCLs, KUWAPs expresadas en la glándula de *P. nigra*. Así mismo, para *X. guentheri* también se reportaron estas mismas toxinas de menor ocurrencia (excepto 5NUCLs y KUWAPs), con la adición de DIESTERs, ACESs Y IPLA2s que no se reportaron para *P. nigra*.

#### 4.5 Niveles de expresión de los componentes encontrados en la glándula de Duvernoy de *P. nigra* y *X. guentheri*

El análisis de expresión reveló una amplia gama de diferentes toxinas presentes en la glándula de Duvernoy de *P. nigra* y *X. guentheri* (Figura 1A-B). Los componentes tóxicos de los individuos 1, 2 y 3 de *P. nigra* representaron el 44.86, 19.14 y 26.16%, respectivamente, del total de transcritos encontrados en sus glándulas de Duvernoy (Figura 2-4). Por el contrario, en *X. guentheri*, se encontró que el 24.40, 37.75 y 38.37 % representaron a los componentes tóxicos del veneno de los individuos 1, 2 y 3 respectivamente (Figura 5-7). Entre las diferentes toxinas reportadas se encontró que las SVMPs y las CRISPs tenían un nivel de expresión mayor a los 50000 TPM, clasificándose como toxinas predominantes del veneno de ambas especies (Figuras 1-7). Sin embargo, las CTLs reportadas para *X. guentheri*, también mostraron un valor mayor a los 50000 TPM, siendo otro componente predominante expresado en su glándula de veneno, además de las 2 toxinas mencionadas anteriormente (Figura 5-7). Adicionalmente, una clase de toxinas poco descrita en venenos de colúbridos, las PLA2s, se encontró como un componente predominante en el veneno de *P. nigra*.

Figura 1.

Perfil de expresión génica de la glándula de Duvernoy de *P. nigra* y *X. guentheri*



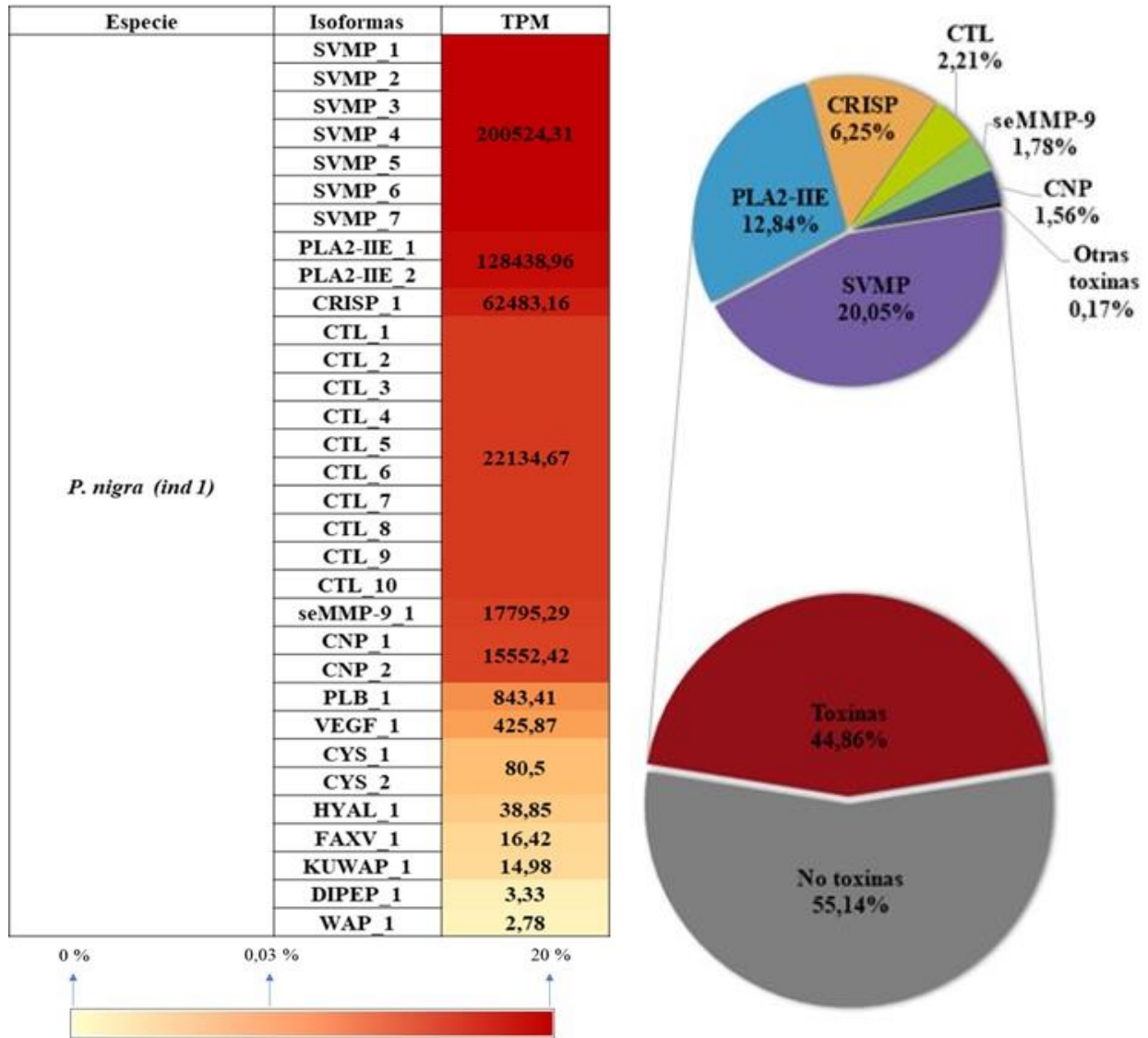
Nota. Perfiles de expresión de los componentes tóxicos de la glándula de Duvernoy de *P. nigra* y *X. guentheri*. **A.** Perfil de expresión de los componentes principales del veneno de serpiente; **B.** Perfil de expresión de los componentes de menor ocurrencia del veneno de serpiente. La intensidad del color rojo es directamente proporcional al valor de  $TPM \times \log$ .

#### *4.5.1 Niveles de Expresión de los Componentes Encontrados en la Glándula de Duvernoy de P. nigra*

**4.5.1.1 Individuo 1.** Dentro de las toxinas anotadas en la glándula de veneno de este individuo, las SVMPs, con un total de 7 isoformas y un valor de TPM de 200524.31, fueron la clase predominante, representando el 20,05% del total del transcriptoma. El siguiente componente tóxico encontrado en la glándula que se expresó en mayor cantidad fueron las PLA2s-IIIE con un valor de TPM de 128438.96 (12,84% del total del transcriptoma), reportando únicamente 2 isoformas. Además, las CRISPs y las CTLs fueron los terceros y cuartos componentes más abundantes con un valor de TPM de 62483.16 y 22134.67 (6,25%; 2,21%), y un número de 1 y 10 isoformas, respectivamente. El quinto componente con mayor expresión fueron las seMMPs-9, con un valor de TPM de 17795.29 (1,78%) y 1 sola isoforma. Finalmente, los CNPs con un TPM de 15552.42 (1,56%), fueron el sexto componente más abundante en la glándula de veneno de este individuo. Las otras clases de toxinas anotadas presentaron valores menores a 1000 TPM y se clasificaron como “otras toxinas”, representando solo el 0,17% del total del transcriptoma (Figura 2).

Figura 2.

Perfil composicional de la Glándula de Duvernoy del Individuo 1 de *P. nigra*

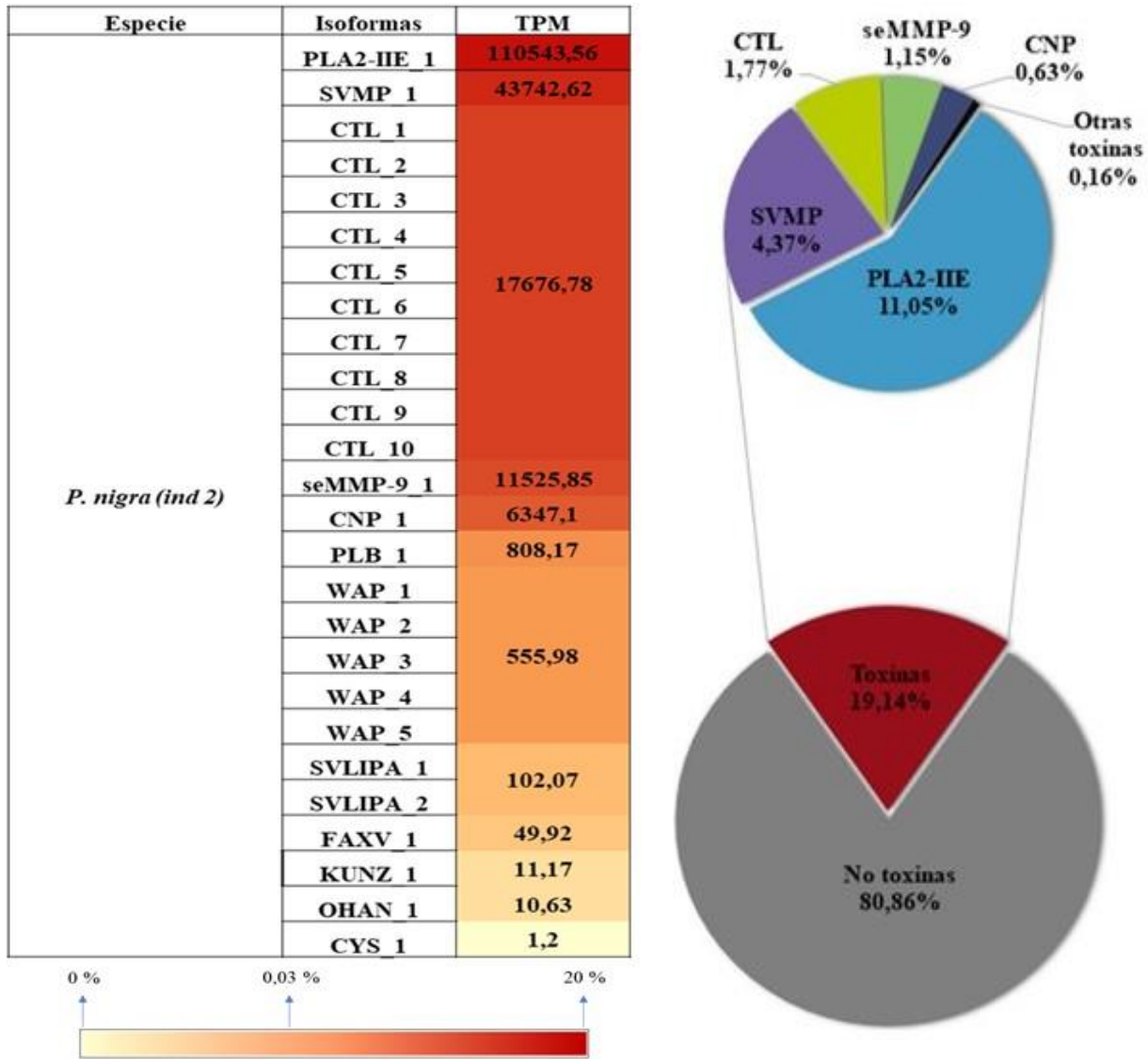


Nota. Niveles de expresión y perfil composicional de la glándula de Duvernoy del individuo 1 de *P. nigra*. A la izquierda se muestran tabuladas las toxinas encontradas y sus respectivos valores de TPM. La intensidad del color rojo es directamente proporcional al valor de  $TPM \times \log$ . A la derecha se muestra el perfil composicional de la glándula de Duvernoy. Las familias tóxicas con un valor de TPM menor a 1000 se agruparon y se representaron como “otras toxinas”.

**4.5.1.2 Individuo 2.** Dentro de las toxinas anotadas en la glándula de veneno de este individuo, las PLA2s-IIIE, con 1 sola isoforma y un valor de TPM de 110543.56 fueron la clase predominante, representando el 11,05% del total del transcriptoma. Las SVMs con 1 isoforma y las CTLs con 10 isoformas, TPM de 43742.62 y 17676.78 (4,37%; 1,77%), respectivamente, fueron el segundo y tercer componente principal. El siguiente componente tóxico encontrado en la glándula que se expresó en mayor abundancia fueron las seMMPs-9 con 1 isoforma y un valor de TPM de 11525.85 (1,15%). Finalmente, los CNPs fueron el quinto componente más abundante con un valor de TPM de 6347.1 y 1 isoforma. Las otras clases de toxinas anotadas presentaron valores menores a 1000 TPM y se clasificaron como “otras toxinas”, representando solo el 0,16% del total del transcriptoma (Figura 3).

Figura 3.

Perfil Composicional de la Glándula de Duvernoy del Individuo 2 de *P. nigra*

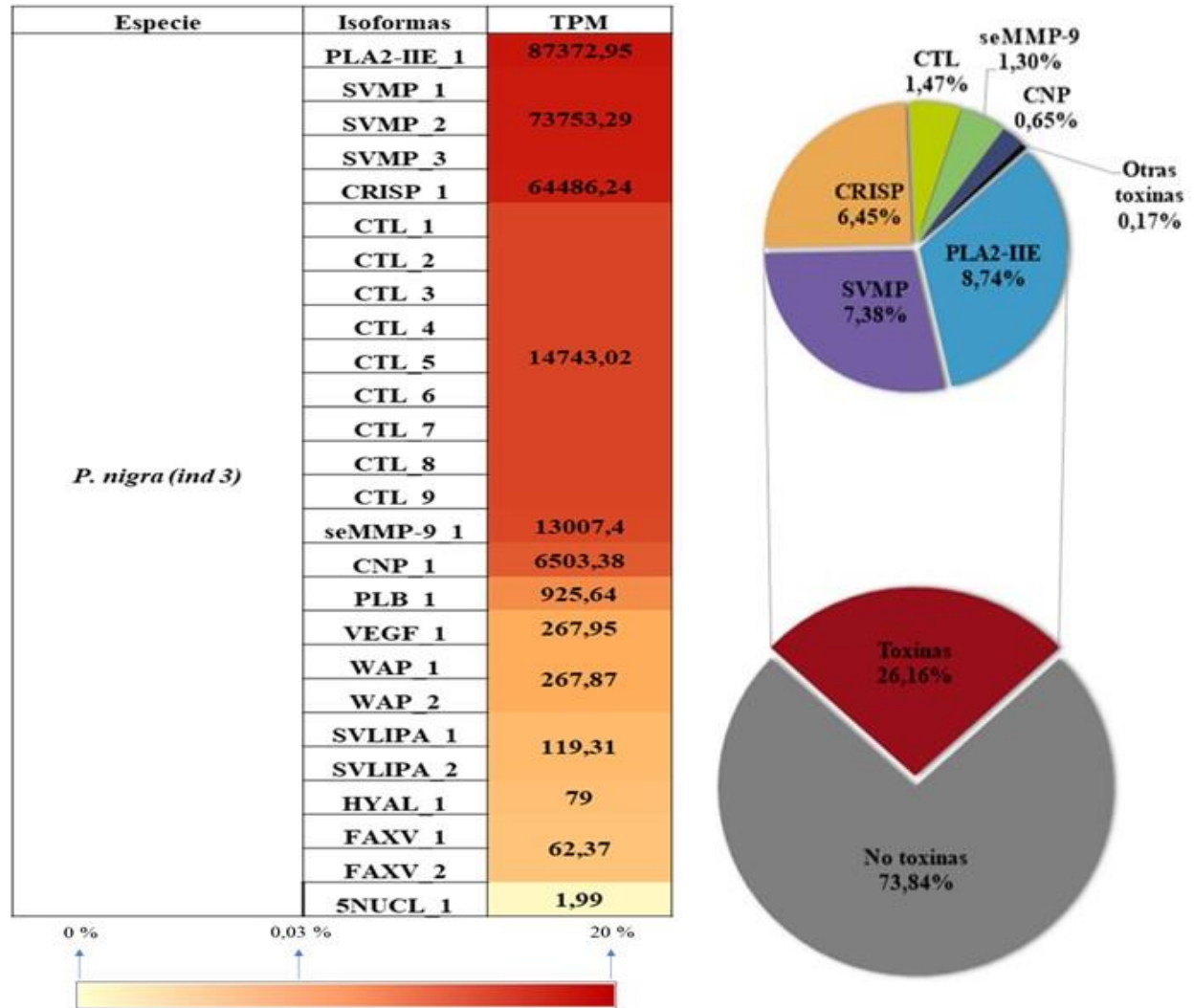


Nota. Niveles de expresión y perfil composicional de la glándula de Duvernoy del individuo 2 de *P. nigra*. A la izquierda se muestran tabuladas las toxinas encontradas y sus respectivos valores de TPM. La intensidad del color rojo es directamente proporcional al valor de  $TPM \times \log$ . A la derecha se muestra el perfil composicional de la glándula de Duvernoy. Las familias tóxicas con un valor de TPM menor a 1000 se agruparon y se representaron como “otras toxinas”.

**4.5.1.3 Individuo 3.** Dentro de las toxinas anotadas en la glándula de veneno de este individuo, las PLA2s-IIIE, con 1 sola isoforma y un valor de TPM de 87372.95 fueron la clase predominante, representando el 8,74% del total del transcriptoma. El siguiente componente tóxico encontrado en la glándula que se expresó en mayor cantidad fueron las SVMPs con 3 isoformas y un valor de TPM de 73753.29 (7,38%). Además, las CRISPs y las CTLs fueron los terceros y cuartos componentes más abundantes con un valor de TPM de 64486.24 y 14743.02 (6,45%; 1,47%), y un número de 1 y 9 isoformas, respectivamente. El quinto componente que se expresó en mayor cantidad fueron las seMMPs-9 con un valor de TPM de 130007.4 (1,30%) y 1 isoforma. Finalmente, los CNPs fueron el sexto componente con mayor expresión con un valor de 6503.38 TPM (0,65%) y 1 isoforma. Las otras clases de toxinas anotadas presentaron valores menores a 1000 TPM y se clasificaron como “otras toxinas”, representando solo el 0,17% del total del transcriptoma (Figura 4).

Figura 4.

Perfil Composicional de la Glándula de Duvernoy del Individuo 3 de *P. nigra*



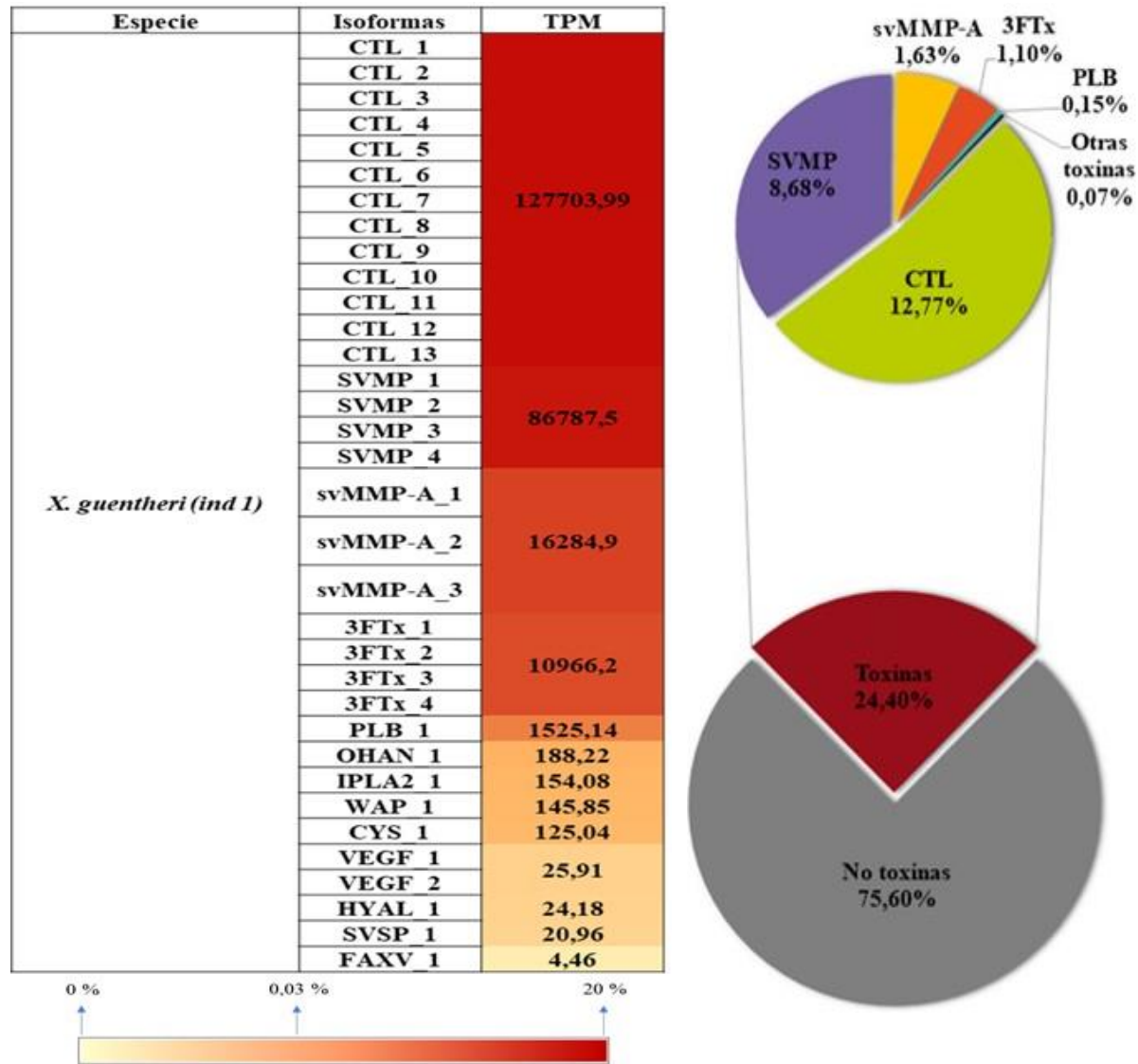
Nota. Niveles de expresión y perfil composicional de la glándula de Duvernoy del individuo 3 de *P. nigra*. A la izquierda se muestran tabuladas las toxinas encontradas y sus respectivos valores de TPM. La intensidad del color rojo es directamente proporcional al valor de  $TPM \times \log$ . A la derecha se muestra el perfil composicional de la glándula de Duvernoy. Las familias tóxicas con un valor de TPM menor a 1000 se agruparon y se representaron como “otras toxinas”.

#### *4.5.2 Niveles de Expresión de los Componentes encontrados en la Glándula de Duvernoy de *X. guentheri**

**4.5.2.1 Individuo 1.** Dentro de las toxinas anotadas en la glándula de veneno de este individuo, las CTLs, con 13 isoformas y un valor de TPM de 127703.99 fueron la clase predominante, representando el 12,77% del total del transcriptoma. El siguiente componente tóxico encontrado en la glándula fueron las SVMPs con un valor de TPM de 86787.5 (8,68%) y 4 isoformas. Además, las svMMPs-A y 3FTxs fueron los terceros y cuartos componentes más abundantes con un valor de TPM de 16284.9 (1,63%) y 10966.2 (1,10%), y un número de 3 y 4 isoformas, respectivamente. Finalmente, las PLBs fueron el quinto componente con mayor expresión con un valor de TPM de 1525.14 (0,15%) y 1 isoforma. Las otras clases de toxinas anotadas presentaron valores menores a 1000 TPM y se clasificaron como “otras toxinas”, representando solo el 0,07% del total del transcriptoma (Figura 5).

Figura 5.

Perfil Composicional de la Glándula de Duvernoy del Individuo 1 de *X. guentheri*

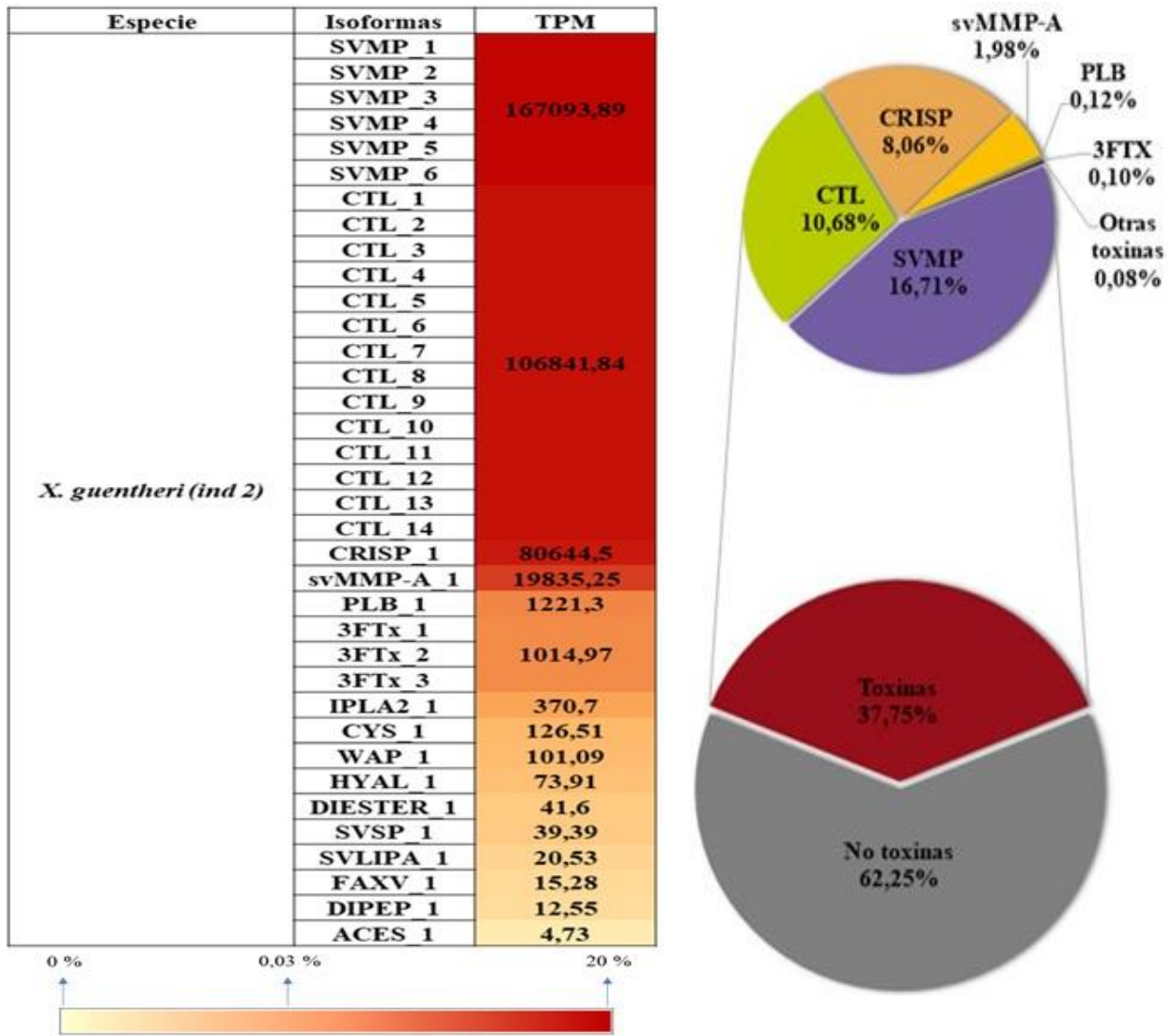


Nota. Niveles de expresión y perfil composicional de la glándula de Duvernoy del individuo 1 de *X. guentheri*. A la izquierda se muestran tabuladas las toxinas encontradas y sus respectivos valores de TPM. La intensidad del color rojo es directamente proporcional al valor de  $TPM \times \log$ . A la derecha se muestra el perfil composicional de la glándula de Duvernoy. Las familias tóxicas con un valor de TPM menor a 1000 se agruparon y se representaron como “otras toxinas”.

**4.5.2.2 Individuo 2.** Dentro de las toxinas anotadas en la glándula de veneno de este individuo, las SVMs, con 6 isoformas y un valor de TPM de 167093.89 fueron la clase predominante, representando el 16,71% del total del transcriptoma. Los siguientes componentes tóxicos que se expresaron en mayor abundancia fueron las CTLs y CRISPs con un valor de TPM de 106841.84 (10,68%) y 80644.5 (8,06%), y un número de 14 y 1 isoformas, respectivamente. Además, el cuarto componente con mayor expresión fueron las svMMPs-A con un valor de TPM de 19835.25 (1,98%) y 1 isoforma. Finalmente, las PLBs y 3FTxs fueron los quintos y sextos componentes con mayor expresión con un valor de TPM de 1221.3 (0,12%) y 1014.97 (0,10%), y un número de 1 y 3 isoformas, respectivamente. Las otras clases de toxinas anotadas presentaron valores menores a 1000 TPM y se clasificaron como “otras toxinas”, representando solo el 0,08% del total del transcriptoma (Figura 6).

Figura 6.

Perfil Composicional de la Glándula de Duvernoy del Individuo 2 de *X. guentheri*

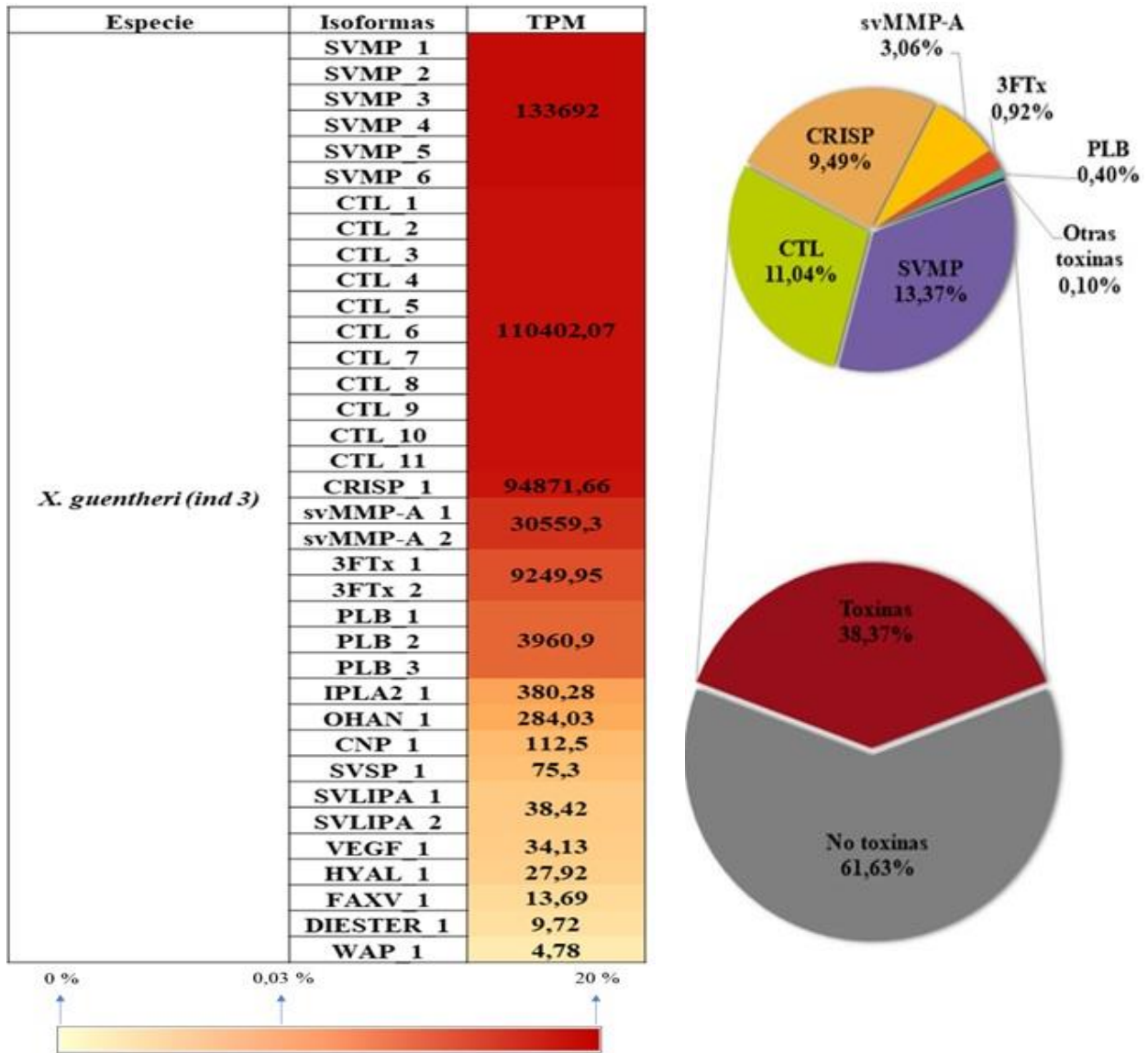


Nota. Niveles de expresión y perfil composicional de la glándula de Duvernoy del individuo 2 de *X. guentheri*. A la izquierda se muestran tabuladas las toxinas encontradas y sus respectivos valores de TPM. La intensidad del color rojo es directamente proporcional al valor de  $TPM \times \log$ . A la derecha se muestra el perfil composicional de la glándula de Duvernoy. Las familias tóxicas con un valor de TPM menor a 1000 se agruparon y se representaron como “otras toxinas”.

**4.5.2.3 Individuo 3.** Dentro de las toxinas anotadas en la glándula de veneno de este individuo, las SVMPs, con 6 isoformas y un valor de TPM de 133692 fueron la clase predominante, representando el 13,37% del total del transcriptoma. El segundo componente con mayor expresión fueron las CTLs con 11 isoformas y un valor de TPM de 110402.07 (11,04). Además, las CRISPs y svMMPs-A fueron los terceros y cuartos componentes con mayor expresión con un valor de TPM de 94871.66 (9,49%) y 30559.3 (3,06%) y un número de 1 y 2 isoformas, respectivamente. El quinto componente con mayor abundancia encontrado en la glándula fueron las 3FTxs con un valor de TPM de 9249.95 (0,92%) y 2 isoformas. Finalmente, las PLBs con 3 isoformas y un valor de TPM de 3960.9 (0,40%) fueron el sexto componente con mayor expresión que se encontró en la glándula de veneno de este individuo. Las otras clases de toxinas anotadas presentaron valores menores a 1000 TPM y se clasificaron como “otras toxinas”, representando solo el 0,10% del total del transcriptoma (Figura 7).

Figura 7.

Perfil Composicional de la Glándula de Duvernoy del Individuo 3 de *X. guentheri*



Nota. Niveles de expresión y perfil composicional de la glándula de Duvernoy del individuo 3 de *X. guentheri*. A la izquierda se muestran tabuladas las toxinas encontradas y sus respectivos valores de TPM. La intensidad del color rojo es directamente proporcional al valor de  $TPM \times \log$ . A la derecha se muestra el perfil composicional de la glándula de Duvernoy. Las familias tóxicas con un valor de TPM menor a 1000 se agruparon y se representaron como “otras toxinas”.

## 5. Discusión

### 5.1 Ensamblaje del Transcriptoma

La evaluación de completitud con BUSCO logró recuperar más del 70% de los 233 genes de vertebrados consultados para cada uno de los 6 transcriptomas ensamblados. Estos resultados estarían indicando que los ensamblajes tenían una buena cobertura del transcriptoma real de cada glándula, permitiendo obtener datos robustos para realizar una buena predicción de los niveles de expresión de cada uno de los transcritos ensamblados. Se encontró que los ensamblajes con mayor cobertura de transcriptoma fueron el del individuo 3 de *P. nigra* y el individuo 1 de *X. guentheri*, con una longitud de transcriptoma ensamblado de 334.432.395 y 212.780.257 bases, y un porcentaje de genes recuperados del 88,84% y 79.40%, respectivamente. Estos valores de completitud de BUSCO son menores a los esperados en un ensamblaje de novo (Shibata et al., 2018). Sin embargo, estos niveles son los observados en trabajos con glándulas de veneno de varias especies de serpiente (Holding et al., 2018). Esto puede deberse al alto grado de especialización de la glándula de Duvernoy para producir toxinas, en detrimento de otros genes fisiológicos (Mackessy et al., 2021). Por ende, el ensamblaje de estos dos individuos presentó una calidad suficiente para obtener datos de expresión robustos.

### 5.2 Componentes Tóxicos

Aunque diversos estudios han identificado a detalle un amplio espectro de toxinas secretadas por serpientes de relevancia médica (Viperidae, Elapidae y Atractaspididae), el repertorio de posibles nuevas toxinas secretadas por colúbridos es todo un mundo por descubrir

(Casewell et al., 2009; Jiang et al., 2011; Leão y Junqueira-de-Azevedo, 2009; Pahari et al., 2007b; Rokyta et al. 2012). En esta pasantía identificamos en *P. nigra* y *X. guentheri* transcritos de toxinas que ya se habían reportado para las familias de serpientes de relevancia médica además de algunas familias de toxinas poco descritas en la literatura y que representan prospectos para futuras investigaciones en estos grupos. Sin embargo, las LAAOs, una clase de toxina funcionalmente importante de los venenos de Elapidae y Viperidae, no fueron encontradas en las glándulas de Duvernoy de *P. nigra* y *X. guentheri*, coincidiendo con la ausencia de esta toxina en la glándula de otros colúbridos (Madrigal et al., 2012; Tasoulis et al., 2020; Weinstein y Kardong, 1994).

### ***5.2.1 Metaloproteinasas de Veneno de Serpiente (SVMPs)***

Las SVMPs son una clase de toxinas prácticamente ubicua en los venenos de serpiente, aunque suele predominar en los de la familia Viperidae (Calvete et al., 2007; Mackessy et al., 2021; Markland y Swenson, 2013; Pla et al., 2017; Rokyta et al., 2012). En esta familia, se encuentran 3 subclases estructuralmente diferentes, llamadas SVMPs-PI, SVMPs-II y SVMPs-PIII. Las SVMPs-PI se componen sólo de un dominio metaloproteinasa catalítico (Figura 8A). Las SVMPs-II presentan, además de ese dominio catalítico, un dominio desintegrina adicional en su región C-terminal (Figura 8A). Finalmente, las SVMPs-PIII se caracterizan por poseer un dominio parecido a la desintegrina y un dominio rico en cisteína, además del dominio metaloproteinasa mencionado para las dos subclases anteriores (Figura 8A) (Fox y Serrano, 2008). Estas diferencias estructurales proporcionan a las SVMPs una gran variedad de actividades. La mayoría de las SVMPs-PI muestran actividad fibrinogenolítica con efectos hemorrágicos leves, mientras la subclase SVMP-II, además de presentar esta capacidad hemorrágica, consigue inhibir la agregación plaquetaria debido a la presencia del dominio desintegrina (Mackessy et al., 2021). Por

otro lado, la subclase SVMP-PIII, reportada en esta pasantía para *P. nigra* y *X. guentheri*, es la subclase más generalista provocando una variedad de actividades, que incluyen hemorragia, apoptosis, activación de protrombina y activación del factor X en la cascada de coagulación (Fox y Serrano 2008; Mackessy et al., 2021). Se encontró que el valor promedio de expresión de estas toxinas en la glándula de *P. nigra* (Pseudoboini) y *X. guentheri* (Xenodontini) fue de 10,6% y 12,92%, respectivamente. Por lo tanto, estos resultados permiten deducir que *X. guentheri* posiblemente tendría una mayor actividad metaloproteinasa que *P. nigra* como ya se ha reportado para otra especie de su tribu (Torres-Bonilla et al., 2017). Torres-Bonilla et al. (2017) demostraron que el veneno de *Erythrolamprus bizona* (Xenodontini) presentó mayor actividad proteolítica que el veneno *Pseudoboa neuwiedii* (Pseudoboini) deduciendo que los componentes responsables de esta actividad eran metaloproteinasas. Enfatizamos, que en esta pasantía no detectamos ningún transcrito de SVMPs-PI ni de SVMPs-II, los cuales solo se reportan para vipéridos (Casewell et al., 2011; Mackessy et al., 2021; Moura-da-Silva et al., 1996). De este modo, la ausencia de SVMPs-PI y SVMPs-II en nuestras muestras está de acuerdo con la hipótesis de que la evolución de esas toxinas fue exclusiva para la familia Viperidae, a partir de un gen ancestral SVMP-PIII, que sufrió una serie de deleciones de dominios, después de la separación de este linaje del resto de serpientes avanzadas (Casewell et al., 2011; Moura-da-Silva et al., 1996).

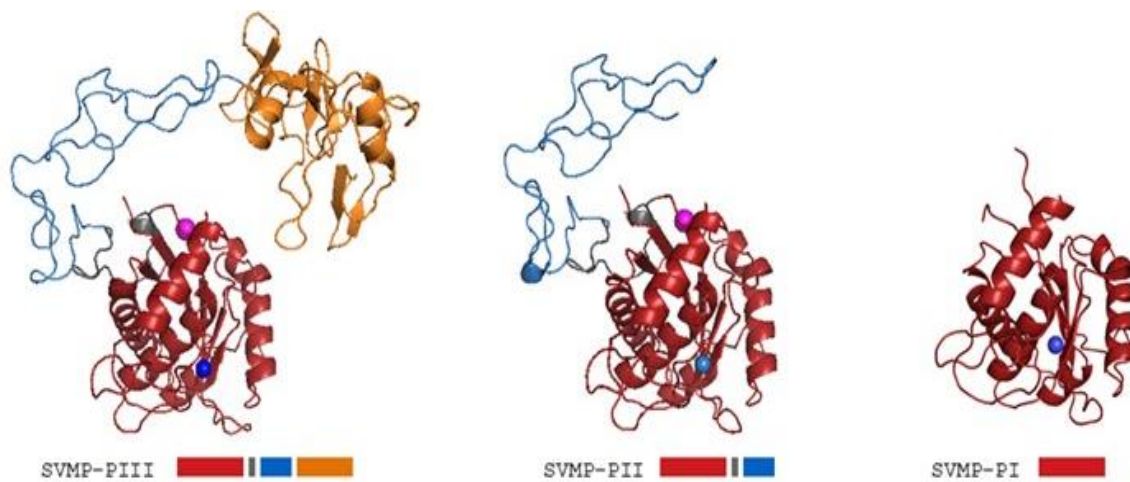
En un alineamiento entre las SVMPs de vipéridos y colúbridos se pudo observar que las secuencias del péptido señal y el pro-dominio estaban altamente conservadas (Figura 8B). Estas secuencias están involucradas en el correcto plegamiento y transporte de las toxinas, vitales para su función (Eder y Fersht, 1995; Mackessy et al., 2021; Sanz y Calvete, 2016). Además, se encontró que el dominio metaloproteinasa de todas las SVMPs (PI, PII, PIII) alineadas presentó un motivo de unión al zinc (HEXXHXXGXXH) idéntico. Esto se debe a que la actividad

proteolítica de todas las SVMPs ocurre a través de la interacción de dicho motivo con un ion de  $Zn^{+2}$  (Oyama y Takahashi, 2017). Sin embargo, las SVMPs de colúbridos presentaron variaciones en algunas regiones de sus secuencias, lo que indica que la presión selectiva no es homogénea en todas las posiciones de los genes de toxinas, y algunas regiones de las proteínas pueden mutar de forma más libre que otras (Sanz y Calvete, 2016). Esto puede deberse a que algunas porciones de la proteína, encargadas de roles importantes como su transporte hasta el lumen glandular o su actividad catalítica, están bajo una mayor presión selectiva. Un análisis exhaustivo de más SVMPs de otras especies podría ayudar a esclarecer estos patrones diferenciales de tasas de sustitución entre dominios de un mismo gen (Brust et al., 2013).

### Figura 8.

#### *Dominios Estructurales de las SVMPs*

A.





### 5.2.2 Fosfolipasas A2 (PLA2s)

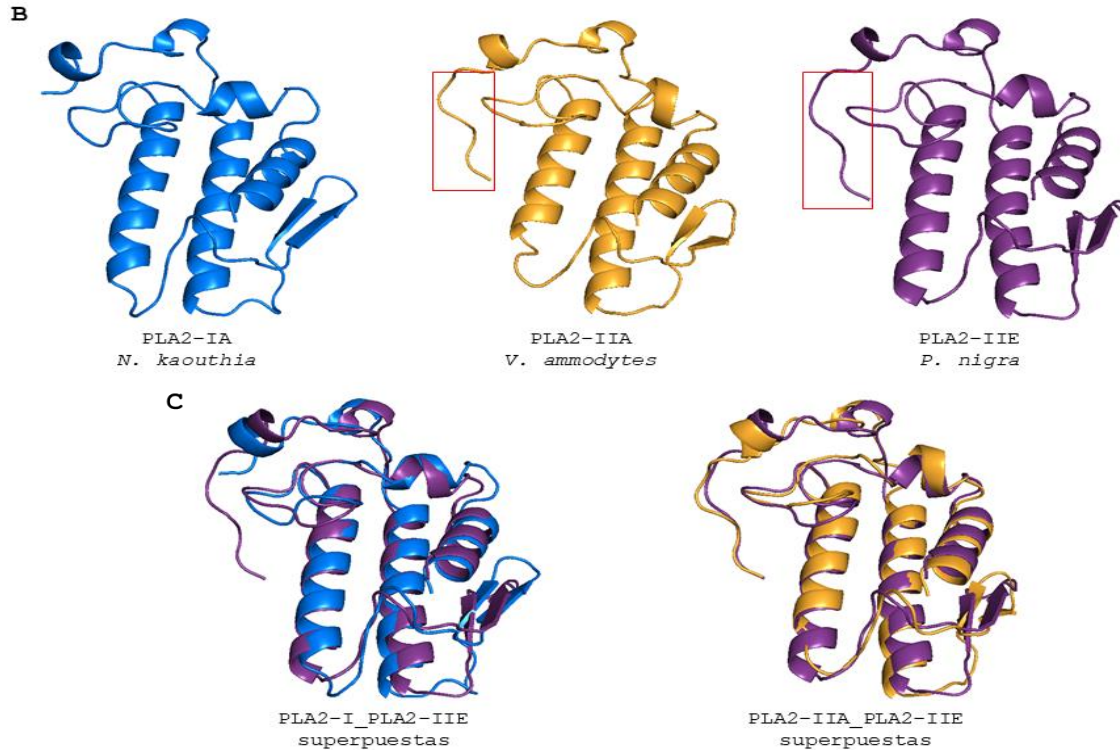
Las PLA2s del veneno de serpiente hacen parte de las principales proteínas tóxicas del veneno de vipéridos y elápidos, desempeñando un papel importante en la inmovilización y captura de sus presas (Mackessy et al., 2021). Entre los tipos de PLA2s que podemos encontrar en Elapidae y Viperidae están las PLA2s-I y las PLA2s-II, respectivamente. Así mismo, las PLA2-I se pueden dividir en la subclase PLA2-IA y la subclase PLA2-IB (Gelb et al., 2000; Lefkowitz et al., 1999; Mackessy et al., 2021). En general, los venenos de elápidos están compuestos principalmente por PLA2s-IA, mientras que las PLA2s-IB se encuentran mayormente en el páncreas de mamíferos (Mackessy et al., 2021). Sin embargo, las PLA2s-IB se han encontrado haciendo parte de los componentes tóxicos de algunas serpientes como *Oxyuranus scutellatus* (Fohlman et al., 1977), *Pseudonaja textilis* (Pearson et al., 1993) y *Micrurus frontalis* (Francis et al., 1997). Por otra parte, el tipo de PLA2-II se encuentran ampliamente distribuidas en los viperidos, y difiere del tipo PLA2-I por tener una extensión C-terminal (Mackessy et al., 2021) (Figura 9B). Las PLA2s-II se pueden dividir también en dos subgrupos con base al aminoácido que se encuentra en la posición 49 (Figura 9A). Esta posición juega un papel importante en la ligación del cofactor de  $\text{Ca}^{+2}$ , necesario para la actividad catalítica de estas proteínas (Lambeau y Gelb, 2008; Scott et al., 1990). Las PLA2s-II que poseen un aminoácido de carga negativa en esta posición (generalmente un aspartato) consiguen ligarse al cofactor y tener actividad catalítica sobre los fosfolípidos de membrana (Scott et al., 1990). Sin embargo, una sustitución en esta posición por un aminoácido de carga positiva (generalmente una lisina) interrumpe la unión del  $\text{Ca}^{+2}$  y produce proteínas con una baja o casi nula actividad catalítica (Maraganore y Heinrikson. 1985).

Además de esta clasificación funcional, Six y Dennis (2000) sugieren otra división de las PLA2s-II en 6 subgrupos (IIA-IIIF), basada en los diferentes tejidos que se pueden encontrar y

algunas características estructurales. Entre esta división se encuentran las PLA2s-IIA y PLA2s-IIB aisladas de los venenos de vipéridos (Fry et al., 2012). Las PLA2s de colúbridos parecen ser más similares a las secuencias de PLA2s de venenos elápidos, y quizás cumplen una función predigestiva o de captura de presas en los venenos de colúbridos (Fry et al., 2008; Huang y Mackessy, 2004). No obstante, en los colúbridos, los niveles de expresión de PLA2 son tan bajos que parecen no ser componentes principales de su veneno, detectándose solo en unas pocas especies (Huang y Mackessy, 2004; Junqueira-de-Azevedo et al., 2016; Torres-Bonilla et al., 2018). En el colúbrido *Trimorphodon biscutatus* se aisló una enzima directamente del veneno y su secuencia indicó que era miembro de las PLA2s-IA, comunes en elápidos. Sin embargo, esta identificación se basó solo en los primeros 50 aminoácidos de la proteína, lo que limita su alcance (Huang y Mackessy, 2004). Por otro lado, Junqueira-de-Azevedo et al. (2016) reportaron, con datos transcriptómicos, expresión de PLA2 del tipo IIE en otro colúbrido perteneciente a la tribu Pseudoboini (*Oxyrhopus guibei*) que parece ser el tipo de PLA2 que ocurre en esta familia de serpientes. Además, estos autores reportan también la nula expresión de este tipo de toxina en la glándula de *Xenodon merremi*. Estos datos coinciden con la alta expresión de PLA2-IIE en *P. nigra* (Pseudoboini) (Figuras 2-4) y la nula expresión de esta toxina en *X. guentheri* (Xenodontini) (Figuras 5-7). Además, el hallazgo de una alta actividad PLA2 del veneno de *Pseudoboa neuwiedii* y los altos niveles de expresión de PLA2-IIE en *P. nigra*, indican que es uno de los componentes principales de este género y posiblemente de la tribu Pseudoboini (Junqueira-de-Azevedo et al. 2016; Torres-Bonilla et al., 2018).

Esto sugiere un posible evento de reclutamiento independiente de una PLA2 en la glándula de veneno de esta tribu de serpiente, diferente a las PLA2s-IIA comúnmente expresadas en las glándulas venenosas de los vipéridos (Fry et al., 2012; Torres-Bonilla et al., 2018). Sin embargo,





*Nota.* **A.** Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de PLA2s encontradas en venenos de serpiente. PLA2-IA (P00596.2) del elápidico *Naja kaouthia*; PLA2-IIIE encontrada en el transcriptoma de la glándula de Duvernoy de *P. nigra* en esta pasantía; PLA2-IIA (P00626.2) del vipérido *Vipera ammodytes*. En azul se muestra un posible motivo conservado entre el que se encuentra el aminoácido D49 (señalado en amarillo). En naranja la extensión C-terminal característica de PLA2s-II **B.** Comparación de las estructuras 3D de PLA2s encontradas en los venenos de serpiente. Las estructuras 3D de PLA2-I, PLA2-IIA y PLA2-IIIE se predijeron por homología utilizando la plataforma en línea SWISS-MODEL con los parámetros predeterminados. El rectángulo rojo señala la extensión C-terminal característica de las PLA2s-II. Las plantillas que se utilizaron fueron 1yxh.1.A para PLA2-IA de *N. kaouthia*, 3g8h.1.A para la PLA2-IIA de *V. ammodytes* y 5wzs.1.A para PLA2-IIIE de *P. nigra*. **C.** Superposición de PLA2-IIIE con PLA2-I y PLA2-IIA.

### 5.2.3 Lectinas Tipo C (CTLs)

Las lectinas de tipo C (CTLs) hacen parte de los componentes principales del veneno de muchos grupos de serpientes (Campos et al., 2016; Ching et al., 2006; Jackson et al., 2013; Junqueira-de-Azevedo y Ho, 2002; McGivern et al., 2014). Estas pueden dividirse en dos grupos; el primero está comprendido por CTLs-Snalecs, que actúan en los principales receptores de glicoproteínas plaquetarias para promover o inhibir eventos de la hemostasia y suelen ser comúnmente encontradas en los venenos de especies con cuadros hemorrágicos (Mackessy et al., 2021). El segundo grupo esta comprendido por CTLs-verdaderas, las cuales se unen a galactosa/lactosa (Arlinghaus et al., 2015; Drickamer, 1999). Estas, en general, no son muy tóxicas, son altamente dependientes del calcio y contienen un motivo de reconocimiento de carbohidratos (CRD) que les permite aglutinar eritrocitos (Arlinghaus et al., 2015; Drickamer, 1999). Entre los grupos de serpientes para los que se reportan las CTLs se encuentran los colúbridos (Campos et al., 2016; Ching et al., 2006). Una reconstrucción filogenética de CTLs realizada por Junqueira-de-Azevedo et al. (2016), demostró que la mayoría de isoformas de CTLs de colúbridos se encuentran anidadas en el clado de CTLs-Snalecs. Estas CTLs fueron encontradas en varios grupos de colúbridos y presentan motivos de unión variables, diferentes de los presentes en las CTLs-verdaderas. Esto concuerda con lo encontrado en las CTLs de *P. nigra* y *X. guentheri* pues la mayoría de las isoformas (posibles parálogos) que fueron anotados presentan motivos variables (Tabla 4). Sin embargo, en esta pasantía se reportaron también isoformas (posibles parálogos) que se asemejan a las CTLs-verdaderas de Elapidae y Viperidae (aquellas con un motivo QPD y EPN de unión a galactosa) (Junqueira-de-Azevedo et al., 2016) (Figura 10B). Por otra parte, el valor promedio de expresión de CTLs en la glándula Duvernoy de *P. nigra* y *X. guentheri* fue de 1,82% y 11,50%, del total del transcriptoma, respectivamente. Esta mayoría de

expresión en *X. guentheri* hace pensar que su veneno podría tener una mayor actividad de CTL que el de *P. nigra*. Además, los altos efectos hemorrágicos reportados previamente para *Erythrolamprus bizona* y *Pseudoboa neuwiedii*, sugieren que el veneno de *P. nigra* y *X. guentheri* podría provocar ese mismo efecto, siendo modulado por la acción de las CTLs encontradas en las glándulas de Duvernoy de estas especies (Lemoine y Rodríguez-Acosta 2003; Torres-Bonilla et al., 2017).

En un alineamiento entre CTLs presentes en las glándulas de veneno de diferentes grupos de serpientes se pudo corroborar la presencia de motivos de unión a carbohidratos. Las CTLs- verdaderas que se encontraron en *P. nigra* y *X. guentheri* presentaron el motivo EPN (también reportado para elápidos) a pesar de que la secuencia de CTL de *X. guentheri* difería notablemente de las otras secuencias (Figura 10A). A diferencia de las CTLs- verdaderas de Dipsadidae y Elapidae, la CTL de vipérido alineada presentó el motivo QPD (Junqueira-de-Azevedo et al., 2016) (Figura 10A). Además, se pudo apreciar que la ausencia del motivo de unión a azúcares en la CTL-Snalec de *X. guentheri* está relacionado con la ausencia del bucle de unión de  $\text{Ca}^{+2}$  involucrado en la unión del azúcar (Figura 10C). Por consiguiente, sugerimos que este motivo además de la capacidad de unirse a carbohidratos, podría jugar un papel importante en el plegamiento característico de las CTLs- verdaderas (Mackessy et al., 2021). Sin embargo, es necesario realizar estudios funcionales para entender mejor el rol que pueden desempeñar las CTLs en el veneno de las serpientes. Se sugiere que el amplio número de isoformas de CTLs (posibles parálogos) reportado en esta pasantía, es el resultado de posibles múltiples eventos de duplicación y polimorfismos de un solo nucleótido (Casewell et al., 2020; Shibata et al., 2018).

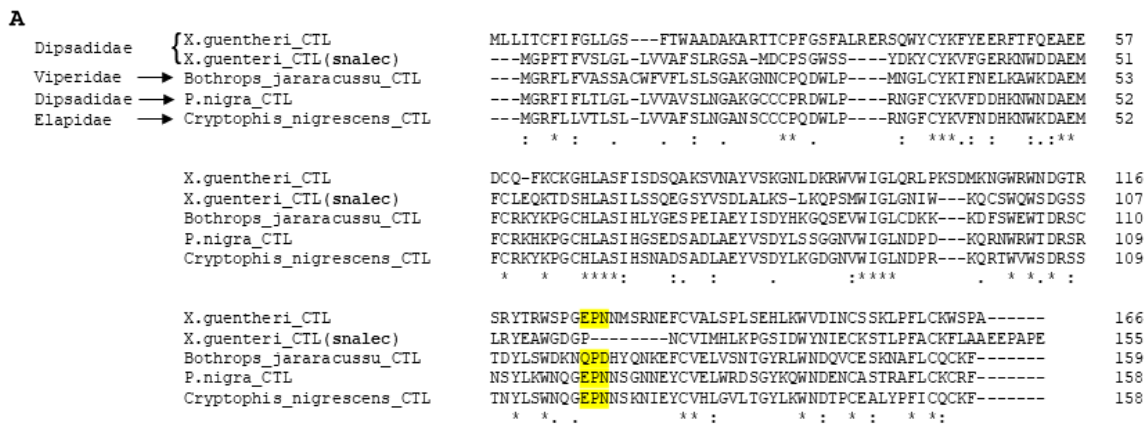
Tabla 4.

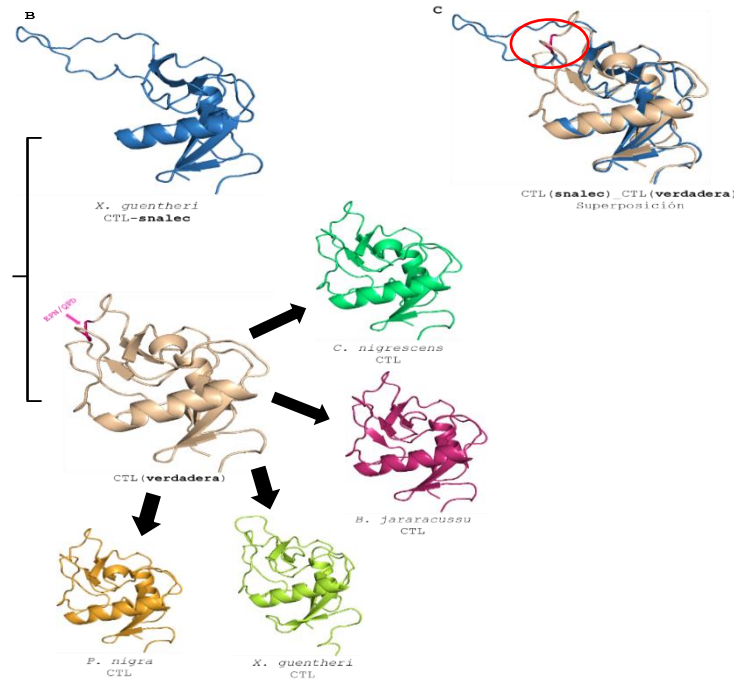
Isoformas de CTLs

Especie	Número de isoformas			<div style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #90EE90; margin-right: 5px;"></div> Snalecs <div style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #FFDAB9; margin-right: 5px; margin-left: 10px;"></div> Verdaderas
	Ind 1	Ind 2	Ind 3	
<i>P. nigra</i>	CTL_1	CTL_1	CTL_1	
	CTL_2	CTL_2	CTL_2	
	CTL_3	CTL_3	CTL_3	
	CTL_4	CTL_4	CTL_4	
	CTL_5	CTL_5	CTL_5	
	CTL_6	CTL_6	CTL_6	
	CTL_7	CTL_7	CTL_7	
	CTL_8	CTL_8	CTL_8	
	CTL_9	CTL_9	CTL_9	
	CTL_10	CTL_10	---	
<i>X. guentheri</i>	CTL_1	CTL_1	CTL_1	
	CTL_2	CTL_2	CTL_2	
	CTL_3	CTL_3	CTL_3	
	CTL_4	CTL_4	CTL_4	
	CTL_5	CTL_5	CTL_5	
	CTL_6	CTL_6	CTL_6	
	CTL_7	CTL_7	CTL_7	
	CTL_8	CTL_8	CTL_8	
	CTL_9	CTL_9	CTL_9	
	CTL_10	CTL_10	CTL_10	
	CTL_11	CTL_11	CTL_11	
	CTL_12	CTL_12	---	
	CTL_13	CTL_13	---	
	---	CTL_14	---	

Figura 10.

Dominios Estructurales de las CTLs





*Nota.* **A.** Alineamiento de CTLs encontradas en los venenos de serpientes. CTLs-verdaderas encontradas en el transcriptoma de la glándula de Duvernoy de *X. guentheri* y *P. nigra*; CTL-Snalec encontrada en *X. guentheri*; CTL (P83519.2) del vipérido *Bothrops jararacussu*; CTL (ACC67946.1) del elápidio *Cryptophis nigrescens*. Motivos de unión a galactosa resaltados en amarillo. **B.** Estructura 3D de una CTL-Snalec y las diferentes CTLs-verdaderas presentes en los venenos de serpiente. Las estructuras 3D de las CTLs-verdaderas y la CTL-Snalec se predijeron por homología utilizando la plataforma en línea SWISS-MODEL con los parámetros predeterminados. Las plantillas que se utilizaron fueron 5f2q.1.A para las CTLs de *B. jararacussu*, *C. nigrescens* y *P. nigra*; 1qdd.1.A y 3wwk.4.B para la CTL-verdadera y CTL-Snalec de *X. guentheri*, respectivamente. **C.** Superposición de CTL-Snalec con CTL-verdadera. El círculo rojo muestra la presencia y ausencia del bucle de unión a carbohidratos en CTLs-verdaderas (en fucsia) y CTLs-Snalecs, respectivamente.

#### 5.2.4 Precursor de Péptidos Natriuréticos Tipo C (CNP<sub>s</sub>)

Los péptidos natriuréticos de tipo C (CNP<sub>s</sub>) del veneno de serpiente son considerados como potentes vasodilatadores e hipotensores, debido a la presencia de múltiples péptidos potenciadores de bradiquinina (BPP<sub>s</sub>), los cuales se utilizaron en el desarrollo de un fármaco llamado Captopril para tratar la hipertensión (Camargo et al., 2012; Fry et al., 2005; Schweitz et al., 1992).

A pesar de lo prometedoras que son estas toxinas para la bioprospección farmacéutica, se han recuperado muy pocos CNP<sub>s</sub> de veneno de serpiente (Casewell et al., 2013; Earl et al., 2012; Vonk et al., 2011). Por otra parte, se ha reportado que los CNP<sub>s</sub> hacen parte de los componentes principales del veneno de elápidos y vipéridos (Fry et al., 2005; Pierre et al., 2005; Pierre et al., 2006). Sin embargo, Ching et al. (2006) aislaron por primera vez un CNP de colúbrido a partir del transcriptoma de la glándula de veneno de *Philodryas olfersii*, sugiriendo que tenía un ancestro común con los precursores de CNP<sub>s</sub> de elápidos y vipéridos.

En esta pasantía aislamos secuencias del precursor de CNP<sub>s</sub> del transcriptoma de la glándula de Duvernoy de *P. nigra* y *X. guentheri*, con niveles de expresión y estructura general similar a los reportados anteriormente para colúbridos (Junqueira-de-Azevedo et al., 2016). Por medio de un alineamiento se observó que la estructura del precursor de CNP<sub>s</sub> de colúbridos se basa en la ausencia de la extensión C-terminal observada en el precursor de CNP<sub>s</sub> de elápidos y de una región que contiene BPP<sub>s</sub> como se observa en el precursor de vipéridos (Almeida et al., 2021; Jackson et al., 2013) (Figura 11).

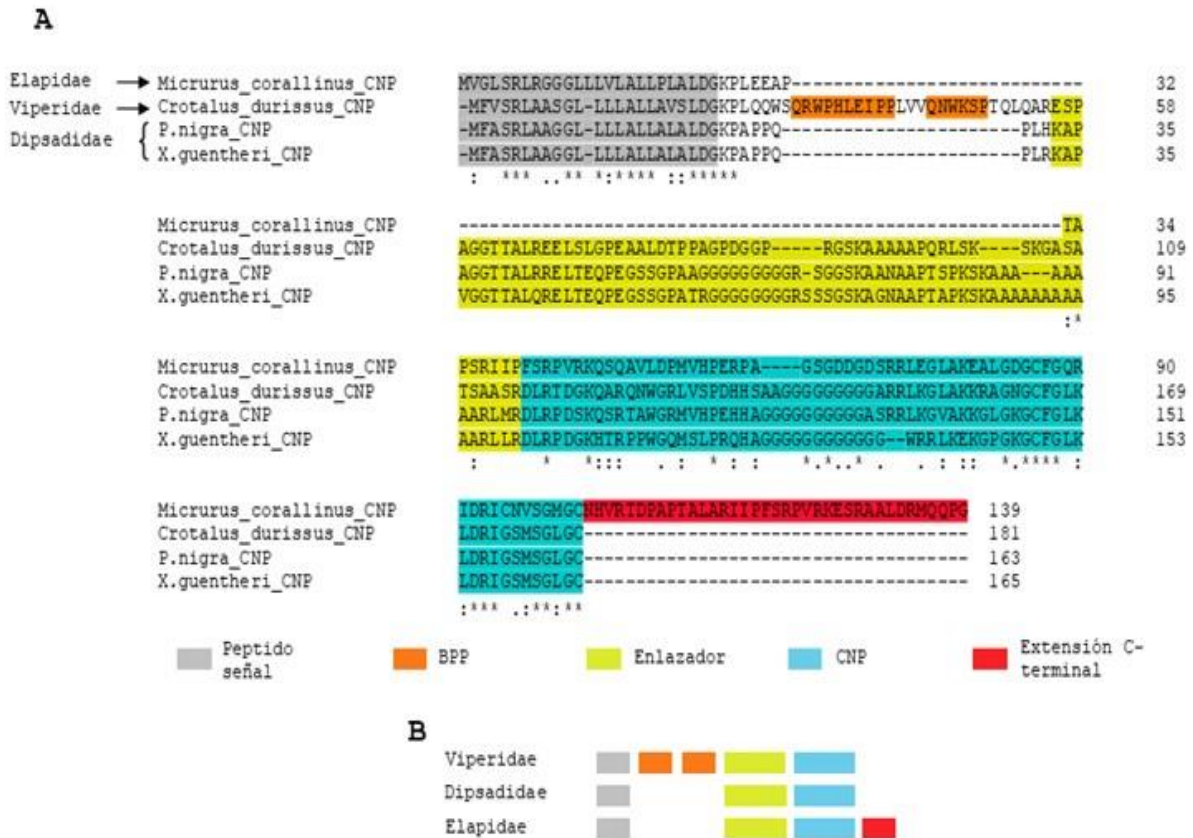
Se ha sugerido que la presencia de la extensión C-terminal es una condición apotípica (derivada) del precursor y que la forma sin extensión C-terminal, que anteriormente solo se aislaba de vipéridos, es la condición plesiotípica (Fry et al., 2010). En consecuencia, nuestros resultados están de acuerdo con la hipótesis que sugiere que la evolución de los precursores de los CNP<sub>s</sub> ha

sido diferente dentro de cada grupo de serpiente y la extensión C-terminal de elápidos ocurrió después del reclutamiento de un precursor de CNPs ancestral en el sistema de veneno de esta familia (Jackson et al., 2013). Por esta razón, se sugiere que todos los CNPs de serpiente se agrupan en un clado monofilético (Ching et al., 2006). Además, estudios funcionales de CNPs aislados de los venenos de elápidos y vipéridos han deducido que estos péptidos aumentarían la permeabilidad capilar facilitando así la difusión de otras toxinas presentes en el veneno (Michel et al., 2000; Schweitz et al., 1992).

Esta misma función es realizada por los BPPs presentes en vipéridos (Almeida et al., 2017). Aunque los precursores de CNPs de colúbridos no posean regiones con BPPs y su función no se encuentra del todo clara, los encontrados en la glándula de *P. nigra* y *X. guentheri* posiblemente cumplirían la misma función que los de elápidos y vipéridos previamente reportados (Michel et al., 2000; Schweitz et al., 1992).

Figura 11.

Estructura del Precursor de CNPs



Nota. Alineamiento de los precursores de CNPs encontrados en los venenos de serpientes. CNP (AAC60341.1) del elápidico *Micrurus corallinus*; CNP (BAE73272.1) del vipérido *Crotalus durissus*; CNP encontradas en el transcriptoma de la glándula de Duvernoy de *X. guentheri* y *P. nigra*. **B.** Modelo lineal de CNPs encontrados en vipéridos, colúbridos y elápidos.

5.2.5 Proteínas Secretoras ricas en Cisteína (CRISPs)

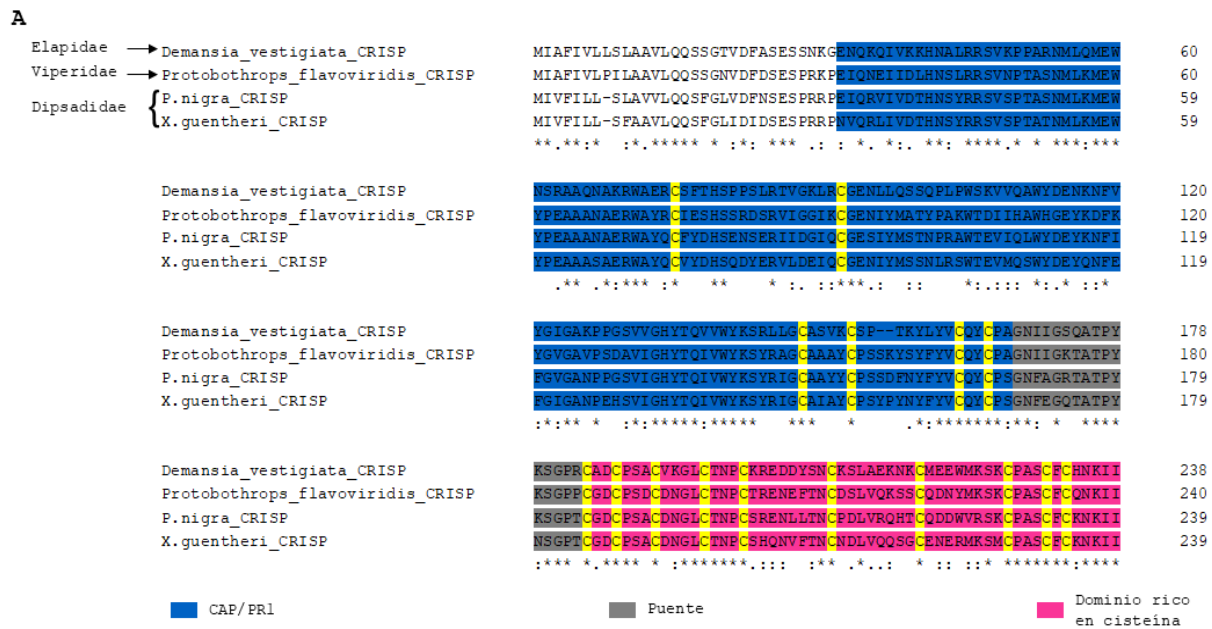
Las proteínas secretoras ricas en cisteína son comunes en muchos venenos de serpientes, incluidos los colúbridos, pero actualmente su actividad biológica como un componente tóxico del veneno no está del todo clara (Modahl y Mackesy, 2019; Peichoto et al., 2009). Peichoto et al.

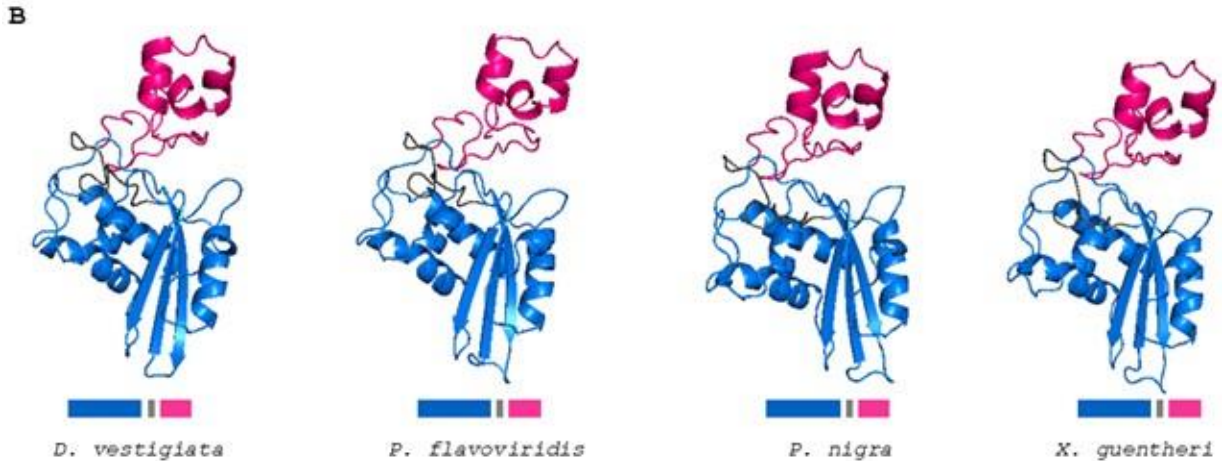
(2009) aislaron una CRISP del veneno de *Philodryas patagoniensis* (patagonina), la cual demostró actividad necrótica hacia el músculo gastrocnemio murino cuando se inyectó por vía intramuscular en dosis mayores o iguales a 43 µg. Además, demostraron que la patagonina no tuvo ningún efecto sobre la agregación de plaquetas humanas y no tuvo actividad proteolítica hacia la azocaseína o el fibrinógeno (Peichoto et al., 2009). Sumado a esto, se ha reportado la helicopsina, una CRISP aislada de *Helicops angulatus* capaz de producir parálisis respiratoria en ratones (Estrella et al., 2011). Aunque Yamazaki et al., (2002) encontraron que otra CRISP, aislada de *Rhabdophis tigrinus*, no tenía ningún efecto neurotóxico. En esta pasantía encontramos sólo 1 isoforma de CRISP presente en el veneno de *P. nigra* y *X. guentheri*, observando que estos resultados concuerdan con la ausencia de múltiples duplicaciones del gen CRISP durante la evolución del linaje de serpientes, por lo que normalmente se encuentra un solo parálogo expresado (Junqueira-de-Azevedo et al., 2016). Además, se encontró que la expresión promedio de esta toxina en las glándulas de *P. nigra* y *X. guentheri* fue del 4,23% y 5,85%, respectivamente, coincidiendo con el promedio de expresión en otros colúbridos (Modahl et al., 2018a, 2018b). Un alineamiento de las CRISPs de *P. nigra* y *X. guentheri* con otras CRISPs pertenecientes a los venenos de otras serpientes demostró que las secuencias alineadas eran casi idénticas, además de encontrar un patrón conservado de 16 residuos de cisteína como ya se había reportado anteriormente (Mackessy et al., 2021) (Figura 12A). De igual manera, las estructuras 3D no variaron mucho, presentado un dominio CAP y un dominio rico en cisteína casi idéntico entre las CRISPs alineadas (Figura 12A-B). En consecuencia, aunque las funciones biológicas de las CRISPs en los venenos aún no están claras, es probable que cumplan diversas funciones biológicas con un alto nivel de conservación estructural, al igual que las PLA2s y las 3FTxs (Modahl et al., 2018a; Pla et al., 2018). Por esta razón, el amplio espectro de actividades biológicas y la estructura conservada de las CRISPs podría

estar relacionado con el fenómeno del cambio acelerado de segmentos en exones para alterar la dirección (ASSET); al que se le atribuye la diversificación funcional de otras toxinas por medio de cambios en segmentos de exones, que modifican su superficie molecular y, por ende, sus blancos moleculares (Doley et al., 2008; Mackessy et al., 2021). Un posible cambio de segmentos en exones del gen de las CRISPs podría haber conllevado a una sustitución de aminoácidos, afectando las propiedades de la superficie general de la proteína expresada (como la densidad de carga y la hidrofobicidad) y, por ende, su función (Doley et al., 2008; Mackessy et al., 2021). Debido a esto, a pesar de poseer una estructura conservada, las posibles funciones de las CRISPs de colúbridos aún son ampliamente desconocidas.

**Figura 12.**

*Dominios Estructurales de las CRISPs*





*Nota. A.* Alineamiento de CRISPs encontradas en los venenos de serpientes. CRISP (A6MFK9.1) del elápido *Demansia vestigiata*; CRISP (Q8JI39.1) del vipérido *Protobothrops flavoviridis*; CRISP encontradas en la glándula de Duvernoy de *P. nigra* y *X. guentheri*. Residuos de cisteína marcados con amarillo. **B.** Estructura 3D y modelo lineal de las CRISPs presentes en los venenos de serpiente. Las estructuras 3D de las CRISPs se predijeron por homología utilizando la plataforma en línea SWISS-MODEL con los parámetros predeterminados. Las plantillas que se utilizaron fueron 2dda.3.A para la CRISP de *D. vestigiata*, 1xta.1.A para la CRISP de *P. nigra* y 1rc9.1.A para la CRISP de *P. flavoviridis* y *X. guentheri*.

### 5.2.6 Serinoproteinasas de Veneno de Serpiente (SVSPs)

Las SVSPs pertenecen a la familia de las serinoproteinasas de la tripsina, las cuales poseen una secuencia y un pliegue de tripsina altamente conservado que consta de dos barriles  $\beta$  y la tríada catalítica conservada, Ser195, His57 y Asp102 (Perona y Craik, 1997). Estas toxinas interfieren con un amplio repertorio de reacciones que involucran la coagulación sanguínea y la hemostasia (Mackessy et al., 2021; Serrano y Maroun, 2005). Mackessy (2008) detectó una actividad en el veneno de *Crotalus adamanteus* similar a la trombina y la calicreína y la atribuyó a la acción de las SVSPs. De igual modo, las SVSPs también se han detectado en algunos

transcriptomas y venenos de colúbridos, como se reportó para el transcriptoma de *X. guentheri* (Ching et al., 2006).

Sin embargo, sus niveles de expresión no fueron tan altos como se reporta para las SVSPs encontradas en los venenos de vipéridos indicando un rol menor en el veneno de esta especie (Mackessy, 2008; Rokyta et al. 2012). El análisis de modelaje estructural de la SVSP de *X. guentheri* mostró que su estructura se asemeja bastante a las reportadas en otras serpientes (Figura 13), lo que concuerda con lo descrito en trabajos previos (Ullah et al., 2013).

### Figura 13.

*Estructura 3D de las SVSPs*



*Nota.* Estructura 3D de SVSPs presentes en los venenos de serpiente. Las estructuras 3D de las SVSPs se predijeron por homología utilizando la plataforma en línea SWISS-MODEL con los parámetros predeterminados. Las plantillas que se utilizaron fueron 1op0.1.A para la SVSP de *B. jararaca* y 3s69.1.A para la SVSP de *O. hannah* y de *X. guentheri*. (Q9PTU8.1) *B. jararaca* y (A8QL56.1) *O. hannah*.

### 5.2.7 Toxinas de 3 Dedos (3FTxs)

Las toxinas de 3 dedos (3FTxs) se caracterizan por presentar 3 bucles de hojas  $\beta$  conservados que se despliegan desde un núcleo hidrofóbico (Roy et al., 2019). Reciben este nombre debido a que los tres bucles que se proyectan desde la región central se asemejan a tres dedos extendidos de la mano (Mackessy et al., 2021; Roy et al., 2019). Estas toxinas representan un componente letal de varios grupos de serpientes de relevancia médica (Fry et al., 2003a; Pahari et al., 2007a). Sin embargo, también se ha reportado una amplia distribución de esta toxina entre los venenos de colúbridos, haciendo referencia a 3FTxs no convencionales (McGivern et al., 2014; Modahl et al., 2018b; Pawlak et al., 2006).

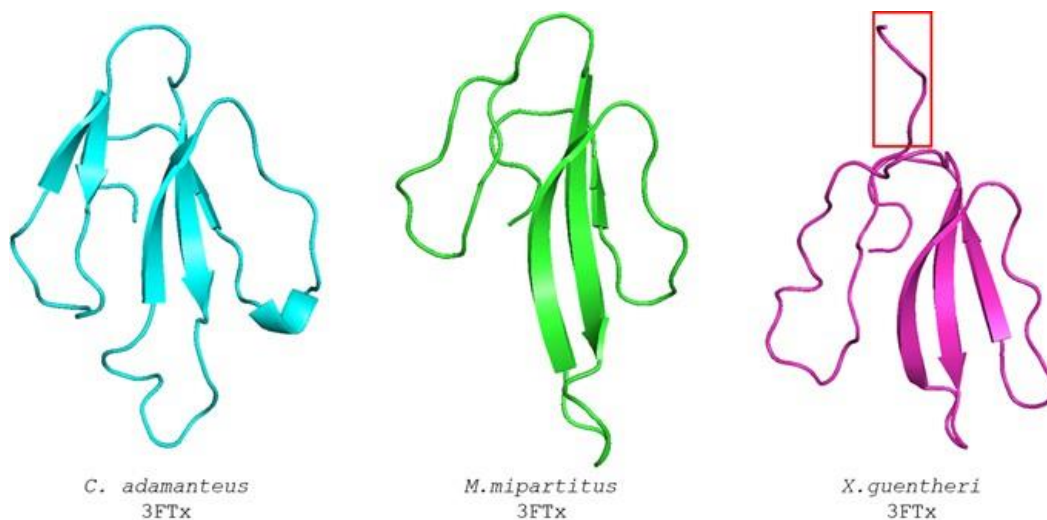
Este tipo de 3FTx se caracteriza por presentar una extensión N-terminal (Figura 14) y una leve neurotoxicidad al demostrar baja letalidad murina en comparación con otras 3FTxs presentes en elápidos y vipéridos (Fry et al., 2003b; Fry et al., 2007; Heyborne y Mackessy, 2013; Mackessy, 2002; Mackessy et al., 2021). La  $\alpha$ -colubritoxina, del veneno de *Coelognathus radiatus*, fue la primera toxina de veneno de colúbridos purificada con estas características y se ha reportado que otras 3FTxs de colúbridos, como la denmotoxina, la irditoxina y la fulgimotoxina son toxinas que actúan de forma selectiva hacia lagartos y aves, con una toxicidad leve o casi nula para los humanos (Heyborne y Mackessy, 2013; Pawlak et al., 2006, 2009).

La presencia de 3FTxs en los venenos de los colúbridos respalda aún más la hipótesis de que los venenos de este grupo, como los de los elápidos y vipéridos, se han sometido a una selección positiva facilitando la adquisición y el manejo de las presas (Mackessy, 1988, 2002; Rokyta et al., 2011). Esta pasantía suma una especie más a la lista de colúbridos con presencia de 3FTxs en sus glándulas de Duvernoy (Juanqueira-de-Azevedo et al., 2016; McGivern et al., 2014; Modahl et al., 2018b; Pawlak et al., 2006). Encontramos en *X. guentheri* transcritos de 3FTxs e

hipotetizamos que esta toxina es específica de anuros, al ser este animal la principal presa del género (Vitt, 1983). Sin embargo, la baja proporción de éstas, indica un rol menor y se sugiere un estudio más detallado, el cual pueda esclarecer la actividad biológica de la 3FTx de *X. guentheri* y sus posibles características funcionales.

#### Figura 14.

##### *Estructura 3D de las 3FTxs*



*Nota.* Estructura 3D de 3FTx presentes en los venenos de serpiente. *C. adamanteus* (JAV48447.1); *M. mipartitus* (B3EWF8.2); secuencia de *X. guentheri* encontrada en esta pasantía. Las estructuras 3D de las 3FTxs se predijeron por homología utilizando la plataforma en línea SWISS-MODEL con los parámetros predeterminados. Las plantillas que se utilizaron fueron 2mj0.1.A para la 3FTx de *C. adamanteus*, 4rud.1.A para la 3FTx de *M. mipartitus* y 2h5f.1.A para la 3FTx de *X. guentheri*. El rectángulo rojo denota la extensión N-terminal característica de las 3FTx no convencionales.

### 5.2.8 Metaloproteinasas de Matriz (MMPs) como Novedad en los Venenos de Serpiente

Recientemente se reportó la expresión de un nuevo grupo de proteínas enzimáticas en la glándula de Duvernoy de 3 tribus de colúbridos (Bayona-Serrano et al., 2020). Estas proteínas, denominadas MMPs (Metaloproteinasas de matriz) están involucradas en diferentes funciones fisiológicas de los vertebrados; como la remodelación de tejidos, cambios ontogenéticos y en procesos reguladores de la matriz extracelular (Nagase et al., 2006). Sin embargo, los colúbridos de las tribus Conophiini, Tachymenini y Xenodontini tuvieron la capacidad de reclutar este grupo de proteínas en la glándula de Duvernoy (Bayona-Serrano et al., 2020). Estas tres tribus reportaron niveles de expresión variables de MMPs, entre el 5.8% al 72.1% del total del transcriptoma, comparables con lo observado en las SVMMPs de vipéridos (Junqueira-de-Azevedo et al., 2015). Además, las MMPs se encontraron como el componente principal de la glándula de Duvernoy de los géneros *Thamnodynastes*, *Tomodon*, *Ptychophis* y *Gomesophis* (Tachymenini); *Erythrolamprus* y *Lygophis* (Xenodontini); y *Conophis* (Conophiini), reportando valores mayores a los 700000 TPM en *E. aesculapii* (Bayona-Serrano et al 2020).

Las MMPs de colúbridos se dividen en dos grupos: el primero está constituido por las MMPs endógenas de serpiente (seMMPs-9) y el segundo, por las MMPs de veneno de serpiente (svMMPs-A y svMMPs-B) (Bayona-Serrano et al., 2020). Las MMPs reportadas en esta pasantía en la glándula de *X. guentheri* pertenecen al subtipo de las svMMPs-A que es una de las formas comúnmente abundantes en las glándulas de Duvernoy de las tribus Xenodontini y Conophiini. Sin embargo, en esta pasantía reportamos un valor medio de expresión de svMMPs-A del 2.22% del total del transcriptoma de la glándula de *X. guentheri*. Por otra parte, las MMPs reportadas en esta pasantía en la glándula de *P. nigra* pertenecen al subtipo seMMP-9 que presentó un valor medio de expresión del 1,41% del total del transcriptoma. Estos valores medios de expresión

coinciden con los niveles de expresión moderados que reportaron Bayona-Serrano et al. (2020) para svMMPs-A y seMMPs-9 en *X. guentheri* y *P. nigrá*, respectivamente.

En esta pasantía se encontraron dos de los tres tipos de MMPs reportados por Bayona-Serrano et al. (2020) en los individuos de *P. nigrá* y *X. guentheri* (seMMPs-9 y svMMPs-A) (figura 15A). La seMMP-9 es un tipo de MMP endógena que tiene la misma organización de dominios de las MMPs-9 presentes en algunos vertebrados (Bayona-Serrano et al., 2020) (Figura 15-16A). Por el contrario, las svMMPs-A sufrieron modificaciones estructurales únicas que las diferencian de las MMPs endógenas reportadas en *P. nigrá* y en otras serpientes (Figura 15-16A). Una hipótesis de la evolución de estas proteínas plantea que los subtipos svMMP-A y svMMP-B se originaron a partir de una seMMP-9 ancestral, que sufrió una pérdida secuencial de dominios (Figura 16A) (Bayona-Serrano et al. 2020).

La evolución de las MMPs de veneno de serpiente, ha sugerido que el origen de estas fue de forma independiente en las tribus Xenodontini, Tachymenini y Conophiini (Bayona-Serrano et al. 2020). Sin embargo, en *X. guentheri*, un representante de Xenodontini, reportamos solamente transcritos de svMMP-A, una forma de MMP que difiere estructuralmente de las svMMPs-B reportadas en otras serpientes de la tribu. En primer lugar, las svMMPs-A son una forma de MMP de veneno de serpiente más simplificadas que las MMPs endógenas y, se cree que se originaron a partir de una seMMP-9, por medio de una delección del dominio hemopexina presente en la región C-terminal (Figura 16A) (Bayona-Serrano et al., 2020). Además, las svMMPs-B, presentes en otras serpientes de la tribu Xenodontini, están compuestas solo por el dominio catalítico ininterrumpido por los 3 dominios de fibronectina que se reportan en las svMMPs-A y seMMPs-9 (Figura 16A). Esta tendencia a la simplificación a partir de la pérdida de dominios se ha visto también en las SVMPs presentes en vipéridos (Figura 16B) (Giorgianni et al., 2020; Sanz y

Calvete, 2016). Además, tanto el dominio hemopexina como los dominios de fibronectina, están codificados por exones bien definidos, por lo que el proceso de delección de estos dominios durante la transición de seMMP-9 a svMMP-A y finalmente a svMMP-B no necesitó de un mecanismo genético tan complejo, ni afectó regiones funcionalmente importantes de la proteína (Bayona-Serrano et al., 2020; Fanjul-Fernández et al., 2010). Bayona-Serrano et al. (2020) sugieren que esta pérdida secuencial de dominios pudo ocurrir gracias a la duplicación génica en tándem del gen ancestral seMMP-9 de forma independiente en algunas tribus de colúbridos. Esta duplicación disminuyó la presión selectiva de las nuevas copias del gen de seMMP-9 debido a la redundancia funcional, permitiendo que mutaran con menos contingencias (Giorgianni et al., 2020; Jackson et al., 2016). Sin embargo, un estudio funcional y genómico de estas toxinas es de vital importancia para identificar las diferentes funciones que podría tener cada uno de los subtipos de MMPs de veneno de serpiente, sus distintas dianas y su organización genómica. Por otro lado, en *P. nigra* reportamos solamente transcritos de seMMPs-9, un tipo de MMP-9 endógena que presenta altos niveles de expresión en la glándula de Duvernoy de algunos colúbridos como lo han reportado Bayona-Serrano et al. (2020).

Finalmente las secuencias reportadas de MMPs en esta pasantía sostienen la hipótesis de la serie de eventos de reclutamiento y evolución de las seMMPs-9 y svMMPs-A en los venenos de Xenodontini, Tachymenini y Conophiini. 1) El gen endofisiológico de seMMP-9 se duplicó a una mayor tasa que la reportada, en la glándula de Duvernoy de algunos colúbridos ancestrales. 2) Esta duplicación de seMMP-9 generó copias de svMMPs ancestrales independientemente en Xenodontini, Tachymenini y Conophiini. Este proceso pudo estar acompañado de la delección del dominio hemopexina generando el subtipo svMMP-A reportado en *X. guentheri*. Además, debió ocurrir un cambio en el promotor que causó una mayor expresión de esta proteína en algún

momento para explicar la alta expresión que encontraron Bayona-Serrano et al. (2020) en los generos *Erythrolamprus* y *Lygophis* de la tribu Xenodontini. 3) Finalmente, dentro de las tribus Xenodontini y Tachymenini surgieron las svMMPs-B, a partir de una elevada duplicación del gen svMMP-A, mediante la delección secuencial de los exones que codifican los dominios de fibronectina (Figura 16A).

Estas nuevas proteínas demuestran lo importante que es explorar las toxinas de serpientes con baja relevancia médica, pues su identificación y caracterización representan una oportunidad para la bioprospección farmacéutica.

### Figura 15.

*Dominios Estructurales de las MMPs*

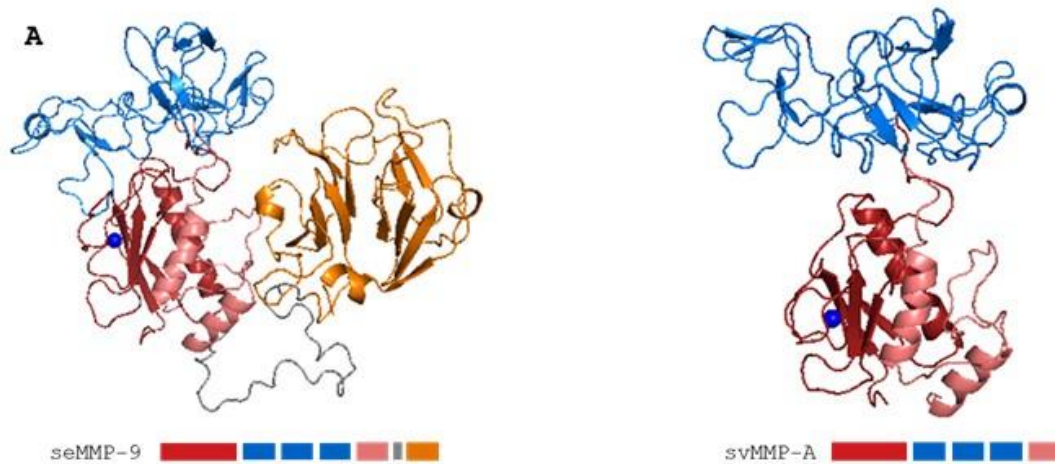
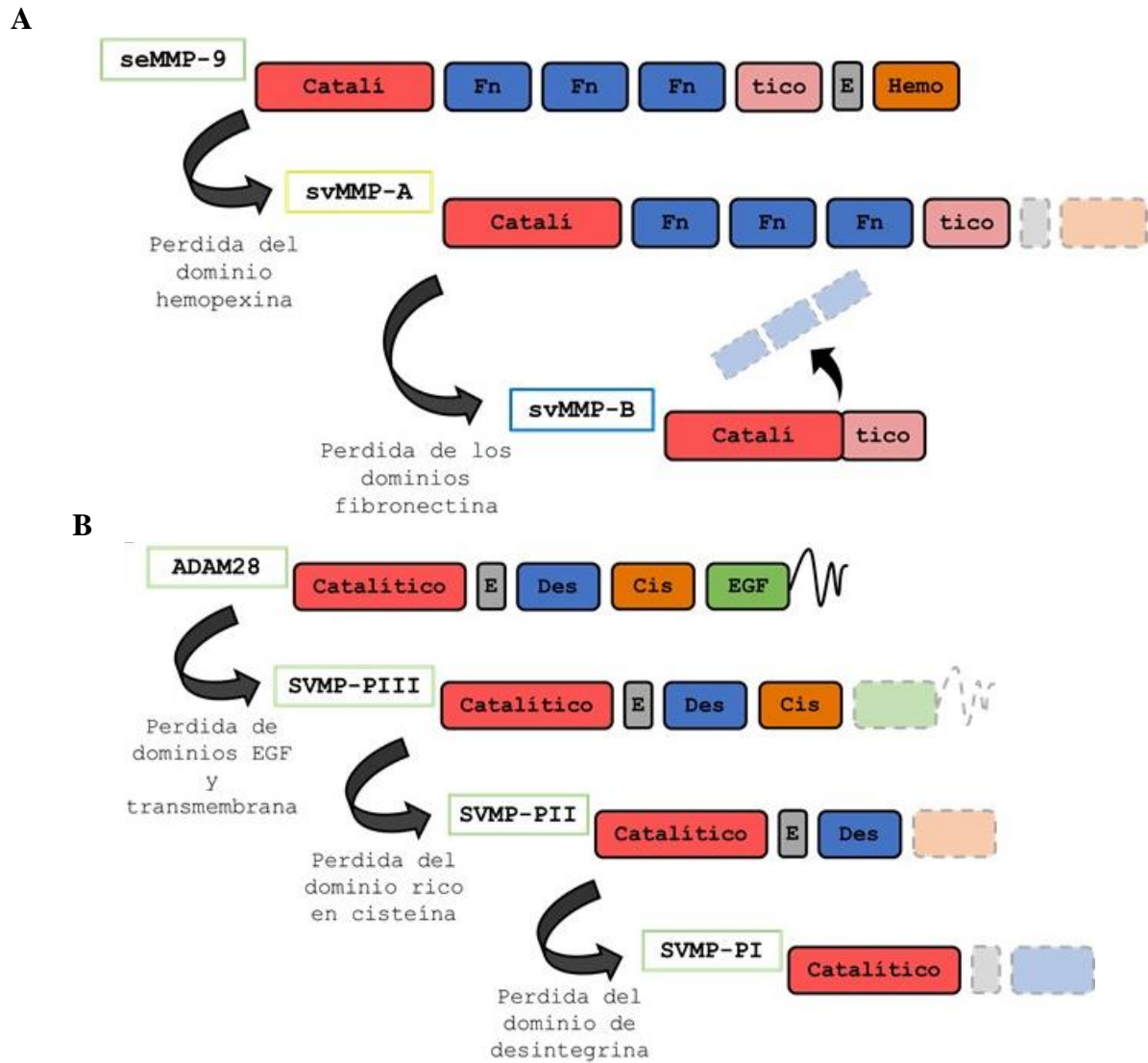




Figura 16.

Modelo Evolutivo de las SVMPs y MMPs



*Nota.* Modelo evolutivo de las dos familias de metaloproteinasas presentes en los venenos de serpiente. **A.** Modelo evolutivo de svMMPs a partir de una MMP-9 endógena de serpiente **B.** Modelo evolutivo de SVMPs a partir del gen endógeno ADAM28. E: enlazador, Des: dominio de desintegrina, Cis: dominio rico en cisteína, EGF: factor de crecimiento endotelial, catalí: primera región del dominio catalítico, tico: región final del dominio catalítico, Fn: dominio de fibronectina, Hemo: dominio hemopexina.

### 5.2.9 Otras Toxinas de Baja Abundancia

Las 15 toxinas restantes, reportadas previamente para *P. nigra* y *X. guentheri* también se han aislado de los venenos de vipéridos y elápidos. Sin embargo, fueron agrupadas como “otras toxinas” (o componentes de veneno menores) debido a que cada una tiene un nivel de expresión relativamente bajo (Modahl y Mackessy, 2019; Rokyta et al., 2012) (Figura 1). Sin embargo, la contribución real de estas toxinas al veneno sigue siendo controversial (Hargreaves et al., 2014). Consecuente a esto, sugerimos realizar una caracterización proteómica y un análisis funcional de los componentes tóxicos presentes en la glándula de Duvernoy de *P. nigra* y *X. guentheri*; para confirmar las toxinas que son secretadas en el veneno y los cuadros de envenenamiento que podrían causar.

### 5.3 Variación en la Composición de los Venenos de Serpiente

Los venenos de serpiente son susceptibles a variar composicionalmente debido al amplio espectro de toxinas que se puede encontrar en ellos (Cipriani et al., 2017; Junqueira-de-Azevedo et al., 2016; Madrigal et al., 2012; Pla et al., 2017). Aunque la variación geográfica del veneno de serpiente se ha reportado en varios casos (Daltry et al., 1996; Jimenez Porras, 1964; Jones, 1976; Rodrigues et al., 1998), recientes análisis transcriptómicos y proteómicos de varios venenos de serpiente han confirmado que la variación del veneno ocurre también entre individuos (Hofmann et al., 2018; Mora-Obando et al., 2014, 2020). Esta variación puede ser a nivel interespecífico como intraespecífico, y puede darse por diferentes factores ecológicos (Lisle Gibbs y Chiucci, 2011; Margres et al., 2016; Núñez, 2009; Pla et al., 2017). En esta pasantía encontramos una variación composicional del veneno de *P. nigra* y *X. guentheri* a nivel tanto interespecífico como intraespecífico.

### 5.3.1 Variación Interespecífica entre *P. nigra* y *X. guentheri*

A pesar de que *P. nigra* y *X. guentheri* pertenecen a la misma subfamilia (Xenodontinae) solo compartieron SVMPs, CNPs, CRISPs, CTLs, DIPEPs, FAXVs, HYALs, MMPs, PLBs, SVLIPAs, CYSSs, OHANs, VEGFs y WAPs del resto de toxinas reportadas en esta pasantía (Tabla 3). Además, Junqueira-de-Azevedo et al. (2016), reportaron que las SVMPs, CRISPs y CTLs se encuentran en la mayoría de grupos de colúbridos. Esto permite sugerir que estas 3 familias proteicas hacen parte de los componentes principales de la mayoría de colúbridos, y por ende deberían poseer un nivel de expresión elevado. Las SVMPs, CRISPs y CTLs reportadas presentaron valores de expresión variables entre las dos especies de la pasantía, sin embargo, se pudo observar que la expresión de CTLs en la glándula de Duvernoy de *X. guentheri* (11,50%) fue aproximadamente 6 veces mayor que la expresión de CTLs de *P. nigra* (1,82%) (Figura 2-7). Esto coincide con el rango de expresión de CTLs en colúbridos, ya que los niveles de expresión de CTLs varía desde un 2% en *Philodryas olfersii* hasta un 21% en *Phalotris mertensi*, del total del transcriptoma (Campos et al., 2016; Ching et al., 2006). Por otro lado, exclusivamente en *X. guentheri*, encontramos transcritos de SVSPs y 3FTxs, dos tipos de familias proteicas que se encuentran en vipéridos y elápidos, respectivamente (Kalita et al., 2018; Madrigal et al., 2012; Pla et al., 2017; Rey-Suárez et al., 2011) (Tabla 3). Sin embargo, los niveles de expresión de SVSPs fueron menores a los reportados en otras especies de la familia (Ching et al. 2006). Además, los niveles de 3FTxs reportados, coincidieron con los niveles de expresión moderados encontrados en *X. merremi* (Junqueira-de-Azevedo et al. 2016). Por otro lado, exclusivamente en *P. nigra*, reportamos transcritos de PLA2s-IIIe con un valor de expresión medio del 10,88% del total del transcriptoma, siendo el componente predominante de la especie (Figura 2-4). Este tipo de fosfolipasa ha sido poco reportada en la literatura, encontrándose en la glándula de Duvernoy de

*Oxyrhopus guibei*, una serpiente de la misma tribu de *P. nigra* y en otros colúbridos (*Dispholidus typus* y *Leioheterodon madagascariensis*) (Junqueira-de-Azevedo et al. 2016; Fry et al., 2012). En conclusión, la variación tanto cuantitativa como cualitativa de los componentes tóxicos de la glándula de *P. nigra* y *X. guentheri*, era esperada, ya que en los colúbridos no existe un patrón conservado de toxinas como en vipéridos (Mackessy et al., 2021). Esto puede deberse a la amplia diversidad ecológica de los colúbridos y, por ende, los diferentes efectos específicos que tienen las toxinas principales de sus venenos para matar determinadas presas (Heyborne y Mackessy, 2013; Mackessy et al., 2021; Pawlak et al., 2006, 2009).

### ***5.3.2 Variación Intraespecífica en P. nigra***

El componente principal de la glándula de Duvernoy varió entre los 3 individuos analizados. En los individuos 2 y 3 las PLA2s-IIE fueron el componente con mayor expresión, mientras que las SVMPs lo fueron en el individuo 1 (Figura 1-4). Además, las CTLs, seMMPs-9 y CNPs se expresaron en la glándula de los tres individuos, sin embargo, los niveles de expresión de estas toxinas fue diferente en cada uno (Figura 1-4). Por otro lado, a pesar de que los individuos 2 y 3 pertenecen a la misma localidad (Apéndice A), reportamos expresión de CRISPs solo en el individuo 3 (Figura 1). Curiosamente el individuo 2 es hembra y el individuo 3 es macho (Apéndice A), lo cual sugiere que la presencia de CRISPs en uno de los dos individuos parece ser causa de variación sexual. Sin embargo, el significado biológico de la variación sexual parece no estar claro (Mackessy et al., 2021) y necesitaríamos de un muestreo mayor para conseguir establecer ese patrón en esta especie. En conclusión, los componentes tóxicos entre los individuos 1, 2 y 3 variaron a un nivel tanto cualitativo como cuantitativo (Figura 2-4). Esta variación puede estar relacionada con varios factores que no conocemos, como la edad de cada uno de los

individuos, la disponibilidad de alimento, las condiciones del hábitat, entre otros (Machado-Braga et al., 2020; Mackessy et al., 2021; Madrigal et al., 2012; Pla et al., 2017; Tasoulis et al., 2020; Zancolli et al., 2019). Por esta razón, se recomienda realizar un estudio que contemple un número mayor de individuos, de diferentes poblaciones, sexos y estados de desarrollo, para conseguir entender de forma más clara el efecto de cada una de estas variables en la composición de toxinas de la glándula de Duvernoy de esta especie.

### 5.3.3 Variación Intraespecífica en *X. guentheri*

El componente principal de la glándula de Duvernoy varió entre los 3 individuos analizados. En los individuos 2 y 3, las SVMPS fueron el componente principal (Figura 6-7), mientras en el individuo 1 fueron las CTLs. Sin embargo, éste último no presentó expresión de CRISPs que sí presentaron los otros dos individuos (Figura 5-7). Además los niveles de expresión de svMMPs-A en el individuo 3 fueron mayores con respecto a los individuos 1 y 2 (Figura 5-7). Por otro lado, el individuo 2 tuvo un nivel de expresión de 3FTxs casi despreciable a comparación de los individuos 1 y 3 (Figura 5-7). En general, se pudo observar una variación tanto cualitativa como cuantitativa, como ya se ha reportado anteriormente para especies de vipéridos y elápidos (Madrigal et al., 2012; Pla et al., 2017; Rey-Suárez et al., 2011; Tasoulis et al., 2020). Sin embargo, los 3 individuos de *X. guentheri* fueron colectados en la misma localidad (Apéndice A), por esta razón, queda por esclarecer que factores son los responsable de la variación de esta especie. De forma similar a *P. nigra* se recomienda realizar un estudio que contemple un número mayor de individuos, de diferentes poblaciones, sexos y estados de desarrollo, para conseguir entender de forma más clara el efecto de cada una de estas variables en la composición de toxinas de la glándula de Duvernoy de esta especie.

#### 5.4 Posibles Efectos Fisiopatológicos del Veneno de *P. nigra* y *X. guentheri*

Los envenenamientos por colúbridos son muy escasos debido al comportamiento dócil de este grupo de serpientes y su baja capacidad de inocular dosis letales al ser humano (Modahl et al., 2015; Torres-Bonilla et al., 2018). Sin embargo, los pocos casos de envenenamiento se han caracterizado principalmente por producir hemorragia, edema, eritema y equimosis (Díaz et al., 2004; diai et al., 2019; Pinto et al., 1991; Santos-Costa et al., 2000). Estos efectos también se han reportado en cuadros de envenenamientos clásicos por vipéridos y se ha sugerido que los componentes responsables de estas manifestaciones son las SVMPs y las PLA2s (Escalante et al., 2011; Gutiérrez et al., 2005; Teixeira et al., 2003). Esto coincide con la alta actividad enzimática de PLA2s y SVMPs reportada para el veneno de *Pseudoboa newwiedii* (Torres-Bonilla et al., 2018). Además, Lemoine y Rodríguez-Acosta (2003) reportaron actividad neurotóxica en el veneno de *Erythrolamprus bizona* (perteneciente a la misma tribu de *X. guentheri*) que producía parálisis flácida y, habían sugerido que el componente responsable de esta actividad posiblemente era una toxina similar a PLA2s neurotóxicas de vipéridos. Sin embargo, estudios más recientes del veneno de *Erythrolamprus* han reportado solo expresión de PLB y demostraron que los efectos neuromusculares en preparaciones de nervios y músculos de pollo eran el resultado de miotoxicidad y no de neurotoxicidad (Torres-Bonilla et al., 2017; Sánchez et al., 2019). En esta pasantía reportamos altos niveles de SVMPs en las glándulas de *P. nigra* y *X. guentheri* (Figuras 2-7). La capacidad de esta toxina de degradar la matriz extracelular permite especular que los venenos de estas dos especies podrían presentar actividad proteolítica y provocar hemorragia (Gay et al., 2005; Mackessy et al., 2021). Además, se ha reportado que los ácidos grasos y lisofosfolípidos productos de la degradación de las membranas lipídicas por PLA2s (D49), pueden generar miotoxicidad y neurotoxicidad presináptica (Mackessy et al 2021; Montecucco y Rossetto,

2000; Tonello y Rigoni, 2017). Por esta razón, los altos niveles de expresión de PLA2s (D49) en la glándula de *P. nigra* sugieren que el veneno de esta especie posiblemente provocaría, mionecrosis y parálisis flácida (Mackessy et al., 2021; Tonello y Rigoni, 2017). Similar a *P. nigra*, el veneno de *X. guentheri* podría provocar también parálisis flácida, sin embargo, en esta especie se vería modulada posiblemente por miotoxicidad como resultado de la actividad de las SVMPS y por 3FTxs (Torres-Bonilla et al., 2017). Las CTLs reportadas en *P. nigra* y *X. guentheri* podrían contribuir con la actividad hemorrágica como es el caso de la botrojaricina de *Bothrops jararaca* (Arocas et al., 1996). Esta toxina inhibe la actividad de la trombina impidiendo la agregación plaquetaria y la coagulación del fibrinógeno (Arocas et al., 1996). Sin embargo, la botrocetina, otra CTL aislada del veneno de *B. jararaca*, está involucrada en la activación de la trombina induciendo agregación plaquetaria (Usami et al., 1993). Este contraste de funciones es el resultado de la capacidad de las CTLs para unirse a diferentes tipos de glicoproteínas plaquetarias; por esta razón, es de vital importancia realizar un análisis funcional y estructural para comprender los diferentes efectos que podrían causar las CTLs de *P. nigra* y *X. guentheri* (Mackessy et al., 2021). Por otra parte, aunque el papel de las CRISPs de veneno sigue siendo poco conocido, un estudio del veneno de *Philodryas patagoniensis* demostró que su CRISP causó mionecrosis (Peichoto et al., 2009). Por esta razón, es posible que las CRISPs reportadas en *P. nigra* y *X. guentheri* contribuyan a una actividad mionecrótica. Sin embargo, es necesario aislar cada una de estas toxinas y realizar estudios funcionales para esclarecer el verdadero rol que tienen en el veneno de *P. nigra* y *X. guentheri*.

## 6. Conclusiones

Los métodos de secuenciación de nueva generación (RNA-seq) facilitan el análisis de los componentes de la glándula de Duvernoy de colúbridos ya que el poco volumen de sus secreciones tóxicas incrementa el tiempo de los análisis bioquímicos, debido las grandes cantidades de veneno requeridas.

El enfoque híbrido para el ensamblaje *de novo* de transcriptomas, utilizando más de un software de ensamblaje, proporciona un mayor número de transcritos esperados y por ende una mayor cobertura del transcriptoma, evitando un sesgo de datos al aprovechar las ventajas de cada uno de los softwares.

El enfoque transcriptómico permitió identificar una plétora de toxinas en la glándula de Duvernoy de *P. nigra* y *X. guentheri*. Sin embargo, ensayos funcionales deberían acompañar el análisis de cualquier veneno, para caracterizar de una forma más completa la relación entre cada toxina y los efectos causados por el veneno.

La eliminación de transcritos quiméricos es crucial para los ensamblajes de transcriptomas y sus posteriores análisis, ya que estas secuencias pueden alterar el patrón de mapeo de lectura y por ende alterar la precisión del análisis de expresión génica.

Detectamos niveles de expresión de toxinas comparables con los reportados previamente para serpientes de relevancia médica. Tres familias tóxicas predominaron en la glándula de Duvernoy de *P. nigra* y *X. guentheri* (SVMPs, CRISPs y CTLs) siendo compartidas con vipéridos y elápidos como componentes principales de sus venenos. Además, el hallazgo de toxinas poco

reportadas en la literatura (PLA2s-IIIE y MMPs), podría representar una oportunidad para comprender la serie de eventos de reclutamiento y duplicación durante su evolución en colúbridos.

## Referencias Bibliográficas

- Acosta, O., Leiva, L. C., Peichoto, M. E., Maruñak, S., Teibler, P., y Rey, L. (2003). Hemorrhagic activity of the Duvernoy's gland secretion of the xenodontine colubrid *Philodryas patagoniensis* from the north-east region of Argentina. *Toxicon*, *41*(8), 1007–1012. doi:10.1016/s0041-0101(03)00074-6
- Aird, S. D., Watanabe, Y., Villar-Briones, A., Roy, M. C., Terada, K., y Mikheyev, A. S. (2013). Quantitative high-throughput profiling of snake venom gland transcriptomes and proteomes (*Ovophis okinavensis* and *Protobothrops flavoviridis*). *BMC Genom*, *14*, 790. doi.org/10.1186/1471-2164-14-790
- Alencar, L. R. V., Gaiarsa, M. P., y Martins, M. (2013). The Evolution of Diet and Microhabitat use in Pseudoboine Snakes. *South American Journal of Herpetology*, *8*(1), 60–66. doi:10.2994/sajh-d-13-00005.1
- Almagro Armenteros, J. J., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., y Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature biotechnology*, *37*(4), 420–423. doi:10.1038/s41587-019-0036-z
- Almeida, D. D., Viala, V. L., Nachtigall, P. G., Broe, M., Gibbs, H. L., Serrano, S., Moura-da-Silva, A. M., Ho, P. L., Nishiyama-Jr, M. Y., y Junqueira-de-Azevedo, I. (2021). Tracking the recruitment and evolution of snake toxins using the evolutionary context provided by the *Bothrops jararaca* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *118*(20), e2015159118. doi:10.1073/pnas.2015159118

- Almeida, J. R., Resende, L. M., Watanabe, R. K., Carregari, V. C., Huancahuire-Vega, S., da S Caldeira, C. A., Coutinho-Neto, A., Soares, A. M., Vale, N., de C Gomes, P. A., Marangoni, S., de A Calderon, L., y Da Silva, S. L. (2017). Snake Venom Peptides and Low Mass Proteins: Molecular Tools and Therapeutic Agents. *Current medicinal chemistry*, 24(30), 3254–3282. doi:10.2174/0929867323666161028155611
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., y amp; Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Archer J., Whiteley G., Casewell N. R., Harrison R. A., y Wagstaff S. C. (2014). VTBuilder: a tool for the assembly of multi isoform transcriptomes. *BMC Bioinformatics*, 15:389.
- Arlinghaus, F., Fry, B., Sunagar, K., Jackson, T., Eble, J., Reeks, T. y Clemetson, K. (2015) Lectin proteins. In: *Venomous Reptiles & Their Toxins: Evolution, Pathophysiology & Biodiscovery* (ed. by B. Fry), pp. 299– 3311. Oxford University Press, New York.
- Arocas, V., Zingali, R. B., Guillin, M. C., Bon, C., y Jandrot-Perrus, M. (1996). Bothrojaracin: a potent two-site-directed thrombin inhibitor. *Biochemistry*, 35(28), 9083–9089. doi:10.1021/bi9600431
- Barros, C.G. (2019). ToxinHunter, GitHub repository, <https://github.com/gebarros/ToxinHunter>.
- Bayona-Serrano, J. D., Viala, V. L., Rautsaw, R. M., Schramer, T. D., Barros-Carvalho, G. A., Nishiyama, M. Y., Freitas-de-Sousa, L. A., Moura-da-Silva, A. M., Parkinson, C.L., Graziotin, F. G., y Junqueira-de-Azevedo, I. L. M. (2020). Replacement and parallel simplification of non-homologous proteinases maintain venom phenotypes in rear-fanged snakes. *Molecular Biology and Evolution*, 37(12), 3563–3575. doi:10.1093/molbev/msaa192

- Brahma, R. K., McCleary, R. J., Kini, R. M., y Doley, R. (2015). Venom gland transcriptomics for identifying, cataloging, and characterizing venom proteins in snakes. *Toxicon*, 93, 1–10. doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.10.022
- Brust, A., Sunagar, K., Undheim, E. A., Vetter, I., Yang, D. C., Casewell, N. R., Jackson, T. N., Koludarov, I., Alewood, P. F., Hodgson, W. C., Lewis, R. J., King, G. F., Antunes, A., Hendrikx, I., y Fry, B. G. (2013). Differential evolution and neofunctionalization of snake venom metalloprotease domains. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 12(3), 651–663. doi:10.1074/mcp.M112.023135
- Bushmanova, E., Antipov, D., Lapidus, A., y Prjibelski, A. D. (2018). RnaSPAdes: A de novo transcriptome assembler and its application to RNA-Seq data. In bioRxiv. bioRxiv.
- Calvete, J. J., Escolano, J., y Sanz, L. (2007). Snake venomomics of Bitis species reveals large intragenus venom toxin composition variation: application to taxonomy of congeneric taxa. *Journal of proteome research*, 6(7), 2732–2745. doi:10.1021/pr0701714
- Calvete, J. J., Marcinkiewicz, C., Monleón, D., Esteve, V., Celda, B., Juárez, P., y Sanz, L. (2005). Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon*, 45(8), 1063–1074. doi:10.1016/j.toxicon.2005.02.024
- Calvete, J.J. (2013). Snake venomomics: From the inventory of toxins to biology. *Toxicon*, 75, 44–62. doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.03.020
- Camargo, A. C. M., Ianzer, D., Guerreiro, J. R., y Serrano, S. M. T. (2012). Bradykinin-potentiating peptides: Beyond captopril. *Toxicon*, 59(4), 516–523. doi:10.1016/j.toxicon.2011.07.013
- Campos, P. F., Andrade-Silva, D., Zelanis, A., Paes Leme, A. F., Rocha, M. M., Menezes, M. C., Serrano, S. M., y Junqueira-de-Azevedo, I. (2016). Trends in the evolution of snake toxins

- underscored by an integrative omics approach to profile the venom of the colubrid *Phalotris mertensi*. *Genome biology and evolution*, 8(8), 2266–2287. doi:10.1093/gbe/evw149
- Casewell, N. R., Harrison, R. A., Wüster, W., y Wagstaff, S. C. (2009). Comparative venom gland transcriptome surveys of the saw-scaled vipers (Viperidae: *Echis*) reveal substantial intra-family gene diversity and novel venom transcripts. *BMC genomics*, 10, 564. doi:10.1186/1471-2164-10-564
- Casewell, N. R., Jackson, T., Laustsen, A. H., y Sunagar, K. (2020). Causes and consequences of snake venom variation. *Trends in pharmacological sciences*, 41(8), 570–581. doi:10.1016/j.tips.2020.05.006
- Casewell, N. R., Wagstaff, S. C., Harrison, R. A., Renjifo, C., y Wuster, W. (2011). Domain loss facilitates accelerated evolution and neofunctionalization of duplicate snake venom metalloproteinase toxin genes. *Molecular Biology and Evolution*, 28(9), 2637–2649. doi:10.1093/molbev/msr091
- Casewell, N. R., Wüster, W., Vonk, F. J., Harrison, R. A., y Fry, B. G. (2013). Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. *Trends in Ecology & Evolution*, 28(4), 219–229. doi:10.1016/j.tree.2012.10.020
- Ching, A. T., Paes Leme, A. F., Zelanis, A., Rocha, M. M., Furtado, M., Silva, D. A., Trugilho, M. R., da Rocha, S. L., Perales, J., Ho, P. L., Serrano, S. M., y Junqueira-de-Azevedo, I. L. (2012). Venomics profiling of *Thamnodynastes strigatus* unveils matrix metalloproteinases and other novel proteins recruited to the toxin arsenal of rear-fanged snakes. *Journal of proteome research*, 11(2), 1152–1162. doi:10.1021/pr200876c

- Ching, A. T., Rocha, M. M., Paes Leme, A. F., Pimenta, D. C., de Fátima D Furtado, M., Serrano, S. M., Ho, P. L., y Junqueira-de-Azevedo, I. L. (2006). Some aspects of the venom proteome of the Colubridae snake *Philodryas olfersii* revealed from a Duvernoy's (venom) gland transcriptome. *FEBS Letters: Federation of European Biochemical Societies*, 580(18), 4417–4422. doi:10.1016/j.febslet.2006.07.010
- Cipriani, V., Debono, J., Goldenberg, J., Jackson, T., Arbuckle, K., Dobson, J., Koludarov, I., Li, B., Hay, C., Dunstan, N., Allen, L., Hendriks, I., Kwok, H. F., y Fry, B. G. (2017). Correlation between ontogenetic dietary shifts and venom variation in Australian brown snakes (*Pseudonaja*). *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP*, 197, 53–60. doi:10.1016/j.cbpc.2017.04.007
- Daltry, J. C., Ponnudurai, G., Shin, C. K., Tan, N. H., Thorpe, R. S., y Wüster, W. (1996). Electrophoretic profiles and biological activities: intraspecific variation in the venom of the Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*). *Toxicon*, 34(1), 67–79. doi:10.1016/0041-0101(95)00122-0
- Diaz, F., Navarrete, L. F., Pefaur, J., y Rodriguez-Acosta, A. (2004). Envenomation by neotropical opisthoglyphous colubrid *Thamnodynastes cf. pallidus* Linne, 1758 (Serpentes:Colubridae) in Venezuela. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 46(5), 287–290. doi:10.1590/s0036-46652004000500011
- Doley, R., Pahari, S., Mackessy, S. P., y Kini, R. M. (2008). Accelerated exchange of exon segments in Viperid three-finger toxin genes (*Sistrurus catenatus edwardsii*; Desert Massasauga). *BMC evolutionary biology*, 8, 196. doi:10.1186/1471-2148-8-196
- Drickamer, K. (1999). C-type lectin-like domains. *Current Opinion in Structural Biology*, 9(5), 585–590. doi:10.1016/s0959-440x(99)00009-3

- Ducancel, F., Durban, J., y Verdenaud, M. (2014). Transcriptomics and venomics: Implications for medicinal chemistry. *Future Medicinal Chemistry*, 15, 1629–1643.
- Earl, S. T. H., Masci, P. P., de Jersey, J., Lavin, M. F., y Dixon, J. (2012). Drug development from Australian elapid snake venoms and the venomics pipeline of candidates for haemostasis: Textilinin-1 (Q8008), Haempatch™ (Q8009) and CoVase™ (V0801). *Toxicon*, 59(4), 456–463. doi:10.1016/j.toxicon.2010.12.010
- Eder, J., y Fersht, A. R. (1995). Pro-sequence-assisted protein folding. *Molecular Microbiology*, 16(4), 609–614. doi:10.1111/j.1365-2958.1995.tb02423.x
- Escalante, T., Rucavado, A., Fox, J. W., y Gutiérrez, J. M. (2011). Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *Journal of Proteomics*, 74(9), 1781–1794. doi:10.1016/j.jprot.2011.03.026
- Estrella, A., Sánchez, E. E., Galán, J. A., Tao, W. A., Guerrero, B., Navarrete, L. F., y Rodríguez-Acosta, A. (2011). Characterization of toxins from the broad-banded water snake *Helicops angulatus* (Linnaeus, 1758): isolation of a cysteine-rich secretory protein, Helicopsin. *Archives of toxicology*, 85(4), 305–313. doi:10.1007/s00204-010-0597-6
- Fanjul-Fernández, M., Folgueras, A. R., Cabrera, S., y López-Otín, C. (2010). Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1803(1), 3–19. doi:10.1016/j.bbamcr.2009.07.004
- Fohlman, J., Lind, P., y Eaker, D. (1977). Taipoxin, an extremely potent presynaptic snake venom neurotoxin. Elucidation of the primary structure of the acidic carbohydrate-containing taipoxin-subunit, a phospholipase homolog. *FEBS Letters: Federation of European Biochemical Societies*, 84(2), 367–371. doi:10.1016/0014-5793(77)80726-6

- Fox, J. W., y Serrano, S. M. (2008). Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *The FEBS journal*, 275(12), 3016–3030. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06466.x
- Francis, B. R., da Silva Júnior, N. J., Seebart, C., Casais e Silva, L. L., Schmidt, J. J., y Kaiser, I. I. (1997). Toxins isolated from the venom of the Brazilian coral snake (*Micrurus frontalis frontalis*) include hemorrhagic type phospholipases A2 and postsynaptic neurotoxins. *Toxicon*, 35(8), 1193–1203. doi:10.1016/s0041-0101(97)00031-7
- Fry, B. G., Scheib, H., Junqueira-de-Azevedo, I., Silva, D. A., y Casewell, N. R. (2012). Novel transcripts in the maxillary venom glands of advanced snakes. *Toxicon*, 59(7-8), 696–708. doi:10.1016/j.toxicon.2012.03.005
- Fry, B. G., Scheib, H., van der Weerd, L., Young, B., McNaughtan, J., Ramjan, S. F., Vidal, N., Poelmann, R. E., y Norman, J. A. (2008). Evolution of an arsenal: structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia). *Molecular & cellular proteomics*, 7(2), 215–246. doi:10.1074/mcp.M700094-MCP200
- Fry, B. G., Wickramaratana, J. C., Lemme, S., Beuve, A., Garbers, D., Hodgson, W. C., y Alewood, P. (2005). Novel natriuretic peptides from the venom of the inland taipan (*Oxyuranus microlepidotus*): isolation, chemical and biological characterisation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 327(4), 1011–1015. doi:10.1016/j.bbrc.2004.11.171
- Fry, B. G., Winter, K., Norman, J. A., Roelants, K., Nabuurs, R. J., van Osch, M. J., Teeuwisse, W. M., van der Weerd, L., McNaughtan, J. E., Kwok, H. F., Scheib, H., Greisman, L., Kochva, E., Miller, L. J., Gao, F., Karas, J., Scanlon, D., Lin, F., Kuruppu, S., Shaw, C.,

- Wong, L., y Hodgson, W. C. (2010). Functional and structural diversification of the Anguimorpha lizard venom system. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 9(11), 2369–2390. doi:10.1074/mcp.M110.001370
- Fry, B. G., Wüster, W., Kini, R. M., Brusica, V., Khan, A., Venkataraman, D., y Rooney, A. P. (2003a). Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins. *Journal of molecular evolution*, 57(1), 110–129. doi:10.1007/s00239-003-2461-2
- Fry, B. G., Wüster, W., Ryan Ramjan, S. F., Jackson, T., Martelli, P., y Kini, R. M. (2003b). Analysis of Colubroidea snake venoms by liquid chromatography with mass spectrometry: evolutionary and toxinological implications. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17(18), 2047–2062. doi:10.1002/rcm.1148
- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S. y Li, W. (2012). CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, 28(23), 3150–3152.
- Gay, C. C., Leiva, L. C., Maruñak, S., Teibler, P., y Acosta de Pérez, O. (2005). Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 46(5), 546–554. doi:10.1016/j.toxicon.2005.06.019
- Gelb, M. H., Min, J. H., y Jain, M. K. (2000). Do membrane-bound enzymes access their substrates from the membrane or aqueous phase: interfacial versus non-interfacial enzymes. *Biochimica et biophysica acta*, 1488(1-2), 20–27. doi:10.1016/s1388-1981(00)00106-2
- Gilles, N., y Servent, D. (2014). The European FP7 Venomics Project. *Future Medicinal Chemistry*, 15, 1611–1612.

Giorgianni, M. W., Dowell, N. L., Griffin, S., Kassner, V. A., Selegue, J. E., y Carroll, S. B. (2020).

The origin and diversification of a novel protein family in venomous snakes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(20), 10911–10920. doi:10.1073/pnas.1920011117

Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., di Palma, F., Birren, B. W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N., y Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29, 644–652.

Gutiérrez J. M., y Sasa M. (2002). Bites and envenomations by colubrid snakes in Mexico and Central America. *Toxin Reviews*, 21(1-2), 105–115. doi:10.1081/TXR-120004743

Gutiérrez, J. M., Rucavado, A., Escalante, T., y Díaz, C. (2005). Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*, 45(8), 997–1011. doi:10.1016/j.toxicon.2005.02.029

Hargreaves, A. D., Swain, M. T., Logan, D. W., y Mulley, J. F. (2014). Testing the Toxicofera: comparative transcriptomics casts doubt on the single, early evolution of the reptile venom system. *Toxicon*, 92, 140–156. doi:10.1016/j.toxicon.2014.10.004

Heise, P. J., Maxson, L. R., Dowling, H. G., y Hedges, S. B. (1995). Higher-level snake phylogeny inferred from mitochondrial DNA sequences of 12S rRNA and 16S rRNA genes. *Molecular biology and evolution*, 12(2), 259–265. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040202

- Heyborne, W. H., y Mackessy, S. P. (2013). Identification and characterization of a taxon-specific three-finger toxin from the venom of the Green Vinesnake (*Oxybelis fulgidus*; family Colubridae). *Biochimie*, 95(10), 1923–1932. doi:10.1016/j.biochi.2013.06.025
- Hite, L. A., Jia, L. G., Bjarnason, J. B., y Fox, J. W. (1994). cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. *Archives of biochemistry and biophysics*, 308(1), 182–191. doi:10.1006/abbi.1994.1026
- Hofmann, E. P., Rautsaw, R. M., Strickland, J. L., Holding, M. L., Hogan, M. P., Mason, A. J., Rokyta, D. R., y Parkinson, C. L. (2018). Comparative venom-gland transcriptomics and venom proteomics of four Sidewinder Rattlesnake (*Crotalus cerastes*) lineages reveal little differential expression despite individual variation. *Scientific reports*, 8(1), 15534. doi:10.1038/s41598-018-33943-5
- Holding, M., Margres, M., Mason, A., Parkinson, C., y Rokyta, D. (2018). Evaluating the performance of de novo assembly methods for venom-gland transcriptomics. *Toxins*, 10(6), 249. doi:10.3390/toxins10060249
- Huang, P., y Mackessy, S. P. (2004). Biochemical characterization of phospholipase A2 (trimorphin) from the venom of the Sonoran Lyre Snake *Trimorphodon biscutatus lambda* (family Colubridae). *Toxicon*, 44(1), 27–36. doi:10.1016/j.toxicon.2004.03.027
- Jackson, T. N., Koludarov, I., Ali, S. A., Dobson, J., Zdenek, C. N., Dashevsky, D., Op den Brouw, B., Masci, P. P., Nouwens, A., Josh, P., Goldenberg, J., Cipriani, V., Hay, C., Hendrikx, I., Dunstan, N., Allen, L., y Fry, B. G. (2016). Rapid Radiations and the Race to Redundancy: An Investigation of the Evolution of Australian Elapid Snake Venoms. *Toxins*, 8(11), 309. doi:10.3390/toxins8110309

- Jackson, T. N., Sunagar, K., Undheim, E. A., Koludarov, I., Chan, A. H., Sanders, K., Ali, S. A., Hendriks, I., Dunstan, N., y Fry, B. G. (2013). Venom down under: dynamic evolution of Australian elapid snake toxins. *Toxins*, 5(12), 2621–2655. doi:10.3390/toxins5122621
- Jiang, Y., Li, Y., Lee, W., Xu, X., Zhang, Y., Zhao, R., Zhang, Y., y Wang, W. (2011). Venom gland transcriptomes of two elapid snakes (*Bungarus multicinctus* and *Naja atra*) and evolution of toxin genes. *BMC genomics*, 12, 1. doi:10.1186/1471-2164-12-1
- Jimenez Porras J. M. (1964). Intraspecific variations in composition of venom of the jumping viper, *Bothrops nummifera*. *Toxicon*, 2, 187–195. doi:10.1016/0041-0101(64)90021-2
- Jones, J. M. (1976). Variations of venom proteins in *Agkistrodon* snakes from North America. *Copeia*, 1976(3), 558–562. doi:10.2307/1443375
- Junqueira-de-Azevedo, I. L., Bastos, C. M., Ho, P. L., Luna, M. S., Yamanouye, N., y Casewell, N. R. (2015). Venom-related transcripts from *Bothrops jararaca* tissues provide novel molecular insights into the production and evolution of snake venom. *Molecular biology and evolution*, 32(3), 754–766. doi:10.1093/molbev/msu337
- Junqueira-de-Azevedo, I., Campos, P., Ching, A., y Mackessy, S. (2016). Colubrid Venom Composition: An -Omics Perspective. *Toxins*, 8(8), 230. doi:10.3390/toxins8080230
- Junqueira-de-Azevedo, I., y Ho, P. L. (2002). A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). *Gene*, 299(1-2), 279–291. doi:10.1016/s0378-1119(02)01080-6
- Kalita, B., Mackessy, S. P., y Mukherjee, A. K. (2018). Proteomic analysis reveals geographic variation in venom composition of Russell's Viper in the Indian subcontinent: Implications for clinical manifestations post-envenomation and antivenom treatment. *Expert Review of Proteomics*, 10, 149-164. doi:10.1080/14789450.2018.1528150

- Kelly, C. M., Barker, N. P., y Villet, M. H. (2003). Phylogenetics of advanced snakes (Caenophidia) based on four mitochondrial genes. *Systematic biology*, 52(4), 439–459. doi:10.1080/10635150390218132
- Kerkvliet, J., de Fouchier, A., van Wijk, M., y Groot, A. T. (2019). The Bellerophon pipeline, improving de novo transcriptomes and removing chimeras. *Ecology and evolution*, 9(18), 10513–10521. doi:10.1002/ece3.5571
- Kraus, F., y Brown, W. M. (1998). Phylogenetic relationships of colubroid snakes based on mitochondrial DNA sequences. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 122(3), 455–487. doi:10.1111/j.1096-3642.1998.tb02159.x
- Krueger, F. (2015). Trim galore. A wrapper tool around Cutadapt and FastQC to consistently apply quality and adapter trimming to FastQ files. Cambridge, UK: Babraham institute.
- Lambeau, G., y Gelb, M. H. (2008). Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annual review of biochemistry*, 77, 495–520. doi:10.1146/annurev.biochem.76.062405.154007
- Leão, L. I., Ho, P. L., y Junqueira-de-Azevedo, I. (2009). Transcriptomic basis for an antiserum against *Micrurus corallinus* (coral snake) venom. *BMC genomics*, 10, 112. doi:10.1186/1471-2164-10-112
- Lefkowitz, L. J., Deems, R. A., y Dennis, E. A. (1999). Expression of group IA phospholipase A2 in *Pichia pastoris*: Identification of a phosphatidylcholine activator site using site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 38, 14174–84. doi:10.1021/bi991432t
- Lemoine, K., y Rodríguez-Acosta, A. (2003). Haemorrhagic, proteolytic and neurotoxic activities produced by Duvernoy's gland secretion from the false coral snake (*Erythrolamprus*

- bizona* Jan 1863) (Serpentes: Colubridae). *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia*, 13(5), 371–377.
- Li, B., y Dewey, C. N. (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 12(1), 323. doi:10.1186/1471-2105-12-323
- Lisle Gibbs, H., y Chiucchi, J. E. (2011). Deconstructing a complex molecular phenotype: population-level variation in individual venom proteins in eastern massasauga Rattlesnakes (*Sistrurus c. catenatus*). *Journal of Molecular Evolution*, 72(4), 383–397. doi:10.1007/s00239-011-9437-4
- Machado Braga, J. R., de Morais-Zani, K., Pereira, D., Sant'Anna, S. S., da Costa Galizio, N., Tanaka-Azevedo, A. M., Gomes Vilarinho, A. R., Rodrigues, J. L., y Teixeira da Rocha, M. M. (2020). Sexual and ontogenetic variation of *Bothrops leucurus* venom. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 184, 127–135. doi:10.1016/j.toxicon.2020.05.028
- Mackessy, S. P. (1988). Venom ontogeny in the pacific rattlesnakes *Crotalus viridis helleri* and *C. v. oreganus*. *Copeia*, 1988(1), 92. doi:10.2307/1445927
- Mackessy, S. P. (2002). Biochemistry and pharmacology of colubrid snake venoms. *Journal of Toxicology*, 21(1-2), 43–83. doi:10.1081/txr-120004741
- Mackessy, S. P. (2008). Venom composition in rattlesnakes: trends and biological significance. *The Biology of Rattlesnakes*. Edited by: Hayes WK, Beaman KR, Cardwell MD, Bush SP. Loma Linda University Press, Loma Linda, California, 495-510.
- Mackessy, S. P. (2021). *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. Chemical Rubber Company Press.

- Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A., Potter, S. C., Finn, R. D., y Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic acids research*, 47(W1), W636–W641. doi:10.1093/nar/gkz268
- Madrigal, M., Sanz, L., Flores-Díaz, M., Sasa, M., Núñez, V., Alape-Girón, A., y Calvete, J. J. (2012). Snake venomomics across genus *Lachesis*. Ontogenetic changes in the venom composition of *Lachesis stenophrys* and comparative proteomics of the venoms of adult *Lachesis melanocephala* and *Lachesis acrochorda*. *Journal of proteomics*, 77, 280–297. doi:10.1016/j.jprot.2012.09.003
- Mapleson, D., Garcia Accinelli, G., Kettleborough, G., Wright, J., y Clavijo, B. J. (2016). KAT: a K-mer analysis toolkit to quality control NGS datasets and genome assemblies. *Bioinformatics*, btw663. doi:10.1093/bioinformatics/btw663
- Maraganore, J. M., y Henrikson, R. L. (1985). The role of lysyl residues of phospholipases A2 in the formation of the catalytic complex. *Biochemical and biophysical research communications*, 131(1), 129–38. doi:10.1016/0006-291x(85)91780-2
- Marçais, G., y Kingsford, C. (2011). A fast, lock-free approach for efficient parallel counting of occurrences of k-mers. *Bioinformatics*, 27(6), 764–770. doi:10.1093/bioinformatics/btr011
- Margres, M. J., McGivern, J. J., Wray, K. P., Seavy, M., Calvin, K., y Rokyta, D. R. (2014). Linking the transcriptome and proteome to characterize the venom of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *Journal of Proteomics*, 96, 145–158.
- Margres, M. J., Walls, R., Suntravat, M., Lucena, S., Sánchez, E. E., y Rokyta, D. R. (2016). Functional characterizations of venom phenotypes in the eastern diamondback rattlesnake

- (*Crotalus adamanteus*) and evidence for expression-driven divergence in toxic activities among populations. *Toxicon*, *119*, 28–38. doi:10.1016/j.toxicon.2016.05.005
- Markland, F. S., Jr, y Swenson, S. (2013). Snake venom metalloproteinases. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, *62*, 3–18. doi:10.1016/j.toxicon.2012.09.004
- McGivern, J. J., Wray, K. P., Margres, M. J., Couch, M. E., Mackessy, S. P., y Rokyta, D. R. (2014). RNA-seq and high-definition mass spectrometry reveal the complex and divergent venoms of two rear-fanged colubrid snakes. *BMC genomics*, *15*(1), 1061. doi:10.1186/1471-2164-15-1061
- Menegucci, R. C., Bernarde, P. S., Monteiro, W. M., Ferreira Neto, P., y Martins, M. (2019). Envenomation by an opisthoglyphous snake, *Erythrolamprus aesculapii* (Dipsadidae), in southeastern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *52*, e20190055. doi:10.1590/0037-8682-0055-2019
- Ménez, A. (1998). Functional architectures of animal toxins: A clue to drug design?. *Toxicon*, *36*(11), 1557–1572. doi:10.1016/s0041-0101(98)00148-2
- Michel, G. H., Murayama, N., Sada, T., Nozaki, M., Saguchi, K., Ohi, H., Fujita, Y., Koike, H., y Higuchi, S. (2000). Two N-terminally truncated forms of C-type natriuretic peptide from habu snake venom. *Peptides*, *21*(5), 609–615. doi:10.1016/s0196-9781(00)00203-5
- Modahl, C. M., Frieze, S., y Mackessy, S. P. (2018a). Transcriptome-facilitated proteomic characterization of rear-fanged snake venoms reveal abundant metalloproteinases with enhanced activity. *Journal of Proteomics*, *187*, 223–234. doi: 10.1016/j.jprot.2018.08.004
- Modahl, C. M., y Mackessy, S. P. (2019). Venoms of Rear-Fanged Snakes: New Proteins and Novel Activities. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *7*. doi:10.3389/fevo.2019.00279

- Modahl, C. M., Mrinalini, Frietze, S., y Mackessy, S. P. (2018b). Adaptive evolution of distinct prey-specific toxin genes in rear-fanged snake venom. *Proceedings. Biological sciences*, 285(1884), 20181003. doi:10.1098/rspb.2018.1003
- Modahl, C. M., Saviola, A.J., y Mackessy, S.P. (2015) Proteomic and genomic approaches to the study of rear-fanged (“colubrid”) snake venoms. In *Handbooks of Toxinology. Venom Genomics and Proteomics*; Gopalakrishnakone, P., Ed.; *Springer Science*: Dordrecht, The Netherlands, p. 23.
- Montecucco, C., y Rossetto, O. (2000). How do presynaptic PLA2 neurotoxins block nerve terminals?. *Trends in biochemical sciences*, 25(6), 266–270. doi:10.1016/s0968-0004(00)01556-5
- Mora-Obando, D., Guerrero-Vargas, J. A., Prieto-Sánchez, R., Beltrán, J., Rucavado, A., Sasa, M., Gutiérrez, J. M., Ayerbe, S., y Lomonte, B. (2014). Proteomic and functional profiling of the venom of *Bothrops ayerbeii* from Cauca, Colombia, reveals striking interspecific variation with *Bothrops asper* venom. *Journal of proteomics*, 96, 159–172. doi:10.1016/j.jprot.2013.11.005
- Moura-da-Silva, A. M., Theakston, R. D., y Crampton, J. M. (1996). Evolution of disintegrin cysteine-rich and mammalian matrix-degrading metalloproteinases: gene duplication and divergence of a common ancestor rather than convergent evolution. *Journal of molecular evolution*, 43(3), 263–269. doi:10.1007/BF02338834
- Nachtigall, P. G., Rautsaw, R. M., Ellsworth, S. A., Mason, A. J., Rokyta, D. R., Parkinson, C. L., y Junqueira-de-Azevedo, I. L. M. (2021). ToxCodAn: a new toxin annotator and guide to venom gland transcriptomics. *Briefings in Bioinformatics*. doi:10.1093/bib/bbab095

- Nagase, H., Visse, R., y Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research*, 69(3), 562–573. doi:10.1016/j.cardiores.2005.12.002
- Nirathanan, S., Gopalakrishnakone, P., Gwee, MCE, Khoo, HE y Kini, RM (2003). Non-conventional toxins from elapid venoms. *Toxicon*, 41(4), 397–407. doi:10.1016/S0041-0101(02)00388-4
- Nishimura, O., Hara, Y., y Kuraku, S. (2019). Evaluating genome assemblies and gene models using gVolante. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1962, 247–256. doi:10.1007/978-1-4939-9173-0\_15
- Núñez, V., Cid, P., Sanz, L., De La Torre, P., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J. M., y Calvete, J. J. (2009). Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards pedomorphism. *Journal of proteomics*, 73(1), 57–78. doi:10.1016/j.jprot.2009.07.013
- Okumura, K., Masui, K., Inoue, S., Ikeda, K., y Hayashi, K. (1999). Purification, characterization and cDNA cloning of a phospholipase A2 inhibitor from the serum of the non-venomous snake *Elaphe quadrivirgata*. *The Biochemical journal*, 341, 165–171.
- Orofino, R. D. P., Pizzatto, L., y Marques, O. A. V. (2010). Biología reproductiva e hábitos alimentares de *Pseudoboa nigra* (Serpentes: Dipsadidae) do cerrado brasileiro. *Phyllomedusa: Journal of Herpetology*, 9(1), 53. doi:10.11606/issn.2316-9079.v9i1p53-61
- Oyama, E., y Takahashi, H. (2017). Structures and Functions of Snake Venom Metalloproteinases (SVMP) from *Protobothrops* venom Collected in Japan. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(8), 1305. doi:10.3390/molecules22081305

- Pahari, S., Bickford, D., Fry, B. G., y Kini, R. M. (2007a). Expression pattern of three-finger toxin and phospholipase A2 genes in the venom glands of two sea snakes, *Lapemis curtus* and *Acalyptophis peronii*: comparison of evolution of these toxins in land snakes, sea kraits and sea snakes. *BMC evolutionary biology*, 7, 175. doi:10.1186/1471-2148-7-175
- Pahari, S., Mackessy, S. P., y Kini, R. M. (2007b). The venom gland transcriptome of the Desert Massasauga rattlesnake (*Sistrurus catenatus edwardsii*): towards an understanding of venom composition among advanced snakes (Superfamily Colubroidea). *BMC molecular biology*, 8, 115. doi:10.1186/1471-2199-8-115
- Pawlak, J., Mackessy, S. P., Fry, B. G., Bhatia, M., Mourier, G., Fruchart-Gaillard, C., Servent, D., Ménez, R., Stura, E., Ménez, A., y Kini, R. M. (2006). Denmotoxin, a three-finger toxin from the colubrid snake *Boiga dendrophila* (Mangrove Catsnake) with bird-specific activity. *The Journal of biological chemistry*, 281(39), 29030–29041. doi:10.1074/jbc.M605850200
- Pawlak, J., Mackessy, S. P., Sixberry, N. M., Stura, E. A., Le Du, M. H., Ménez, R., Foo, C. S., Ménez, A., Nirthanan, S., y Kini, R. M. (2009). Irditoxin, a novel covalently linked heterodimeric three-finger toxin with high taxon-specific neurotoxicity. *FASEB journal: publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(2), 534–545. doi:10.1096/fj.08-113555
- Pearson, J. A., Tyler, M. I., Retson, K. V., y Howden, M. E. (1993). Studies on the subunit structure of textilotoxin, a potent presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian common brown snake (*Pseudonaja textilis*). 3. The complete amino-acid sequences of all the subunits. *Biochimica et biophysica acta*, 1161(2-3):223–229. doi:10.1016/0167-4838(93)90217-f

- Peichoto, M. E., Mackessy, S. P., Teibler, P., Tavares, F. L., Burckhardt, P. L., Breno, M. C., Acosta, O., y Santoro, M. L. (2009). Purification and characterization of a cysteine-rich secretory protein from *Philodryas patagoniensis* snake venom. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP*, 150(1), 79–84. doi:10.1016/j.cbpc.2009.03.002
- Pierre, L. S., Woods, R., Earl, S., Masci, P. P., y Lavin, M. F. (2005). Identification and analysis of venom gland-specific genes from the coastal taipan (*Oxyuranus scutellatus*) and related species. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(22), 2679–2693. doi:10.1007/s00018-005-5384-9
- Pierre, L. S., Flight, S., Masci, P. P., Hanchard, K. J., Lewis, R. J., Alewood, P. F., de Jersey, J., y Lavin, M. F. (2006). Cloning and characterisation of natriuretic peptides from the venom glands of Australian elapids. *Biochimie*, 88(12), 1923–1931. doi:10.1016/j.biochi.2006.06.014
- Pinto, R. N. L., da Silva, N. J., y Aird, S. D. (1991). Human envenomation by the South American opisthoglyph *Clelia clelia plumbea* (Wied). *Toxicon*, 29(12), 1512–1516. doi:10.1016/0041-0101(91)90008-f
- Pla, D., Petras, D., Saviola, A. J., Modahl, C. M., Sanz, L., Pérez, A., Juárez, E., Fietze, S., Dorrestein, P. C., Mackessy, S. P., y Calvete, J. J. (2018). Transcriptomics-guided bottom-up and top-down venomomics of neonate and adult specimens of the arboreal rear-fanged Brown Treesnake, *Boiga irregularis*, from Guam. *Journal of proteomics*, 174, 71–84. doi:10.1016/j.jprot.2017.12.020
- Pla, D., Sanz, L., Sasa, M., Acevedo, M. E., Dwyer, Q., Durban, J., Pérez, A., Rodriguez, Y., Lomonte, B., y Calvete, J. J. (2017). Proteomic analysis of venom variability and ontogeny

- across the arboreal palm-pitvipers (genus *Bothriechis*). *Journal of proteomics*, 152, 1–12. doi:10.1016/j.jprot.2016.10.006
- Prezotto-Neto, J. P., Kimura, L. F., Alves, A. F., Gutiérrez, J. M., Otero, R., Suárez, A. M., Santoro, M. L., y Barbaro, K. C. (2016). Biochemical and biological characterization of *Bothriechis schlegelii* snake venoms from Colombia and Costa Rica. *Experimental Biology and Medicine*, 241(18), 2075–2085. doi:10.1177/1535370216660214
- Pyron, R. A., Burbrink, F. T., Colli, G. R., de Oca, A. N., Vitt, L. J., Kuczynski, C. A., y Wiens, J. J. (2011). The phylogeny of advanced snakes (Colubroidea), with discovery of a new subfamily and comparison of support methods for likelihood trees. *Molecular phylogenetics and evolution*, 58(2), 329–342. doi:10.1016/j.ympev.2010.11.006
- Pyron, R. A., Burbrink, F. T., y Wiens, J. J. (2013). A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC evolutionary biology*, 13, 93. doi:10.1186/1471-2148-13-93
- Rodrigues, V. M., Soares, A. M., Mancin, A. C., Fontes, M. R., Homsí-Brandeburgo, M. I., y Giglio, J. R. (1998). Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. *Comparative biochemistry and physiology. Molecular and integrative physiology*, 121(3), 215–222. doi:10.1016/s1095-6433(98)10136-8
- Rokyta, D. R., Lemmon, A. R., Margres, M. J., y Aronow, K. (2012). The venom-gland transcriptome of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *BMC Genomics*, 13, 312.
- Rokyta, D. R., Wray, K. P., Lemmon, A. R., Lemmon, E. M., y Caudle, S. B. (2011). A high-throughput venom-gland transcriptome for the Eastern Diamondback Rattlesnake

- (*Crotalus adamanteus*) and evidence for pervasive positive selection across toxin classes. *Toxicon*, 57(5), 657–671. doi:10.1016/j.toxicon.2011.01.008
- Roy, A., Qingxiang, S., Alex, C., Rajagopalan, N., Jobichen, C., Sivaraman, J., y Kini, R. M. (2019). Identification of a  $\alpha$ -helical molten globule intermediate and structural characterization of  $\beta$ -cardiotoxin, an all  $\beta$ -sheet protein isolated from the venom of *Ophiophagus hannah* (king cobra). *Protein science : a publication of the Protein Society*, 28(5), 952–963. doi:10.1002/pro.3605
- Sánchez, M. N., Teibler, G. P., Sciani, J. M., Casafus, M. G., Maruñak, S. L., Mackessy, S. P., y Peichoto, M. E. (2019). Unveiling toxicological aspects of venom from the Aesculapian False Coral Snake *Erythrolamprus aesculapii*. *Toxicon*. doi:10.1016/j.toxicon.2019.04.007
- Santos-Costa, M. C., Outeiral, A. B., D'Agostini, F. M., y Cappellari, L. H. (2000). Envenomation by the neotropical colubrid *Boiruna maculata* (Boulenger, 1896): a case report. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 42(5), 283–286. doi:10.1590/s0036-46652000000500008
- Sanz, L., y Calvete, J. J. (2016). Insights into the Evolution of a Snake Venom Multi-Gene Family from the Genomic Organization of *Echis ocellatus* SVMP Genes. *Toxins*, 8(7), 216. doi:10.3390/toxins8070216
- Saviola, A. J., Peichoto, M. E., y Mackessy, S. P. (2014) Rear-fanged snake venoms: An untapped source of novel compounds and potential drug leads. *Toxin Reviews*, 33, 185–201.
- Schweitz, H., Vigne, P., Moinier, D., Frelin, C., y Lazdunski, M. (1992). A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *Journal of Biological Chemistry*, 267(20), 13928–13932. doi:10.1016/s0021-9258(19)49658-0

- Scott, D. L., White, S. P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M. H., y Sigler, P. B. (1990). Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2. *Science (New York, N.Y.)*, 250(4987), 1541–1546. doi:10.1126/science.2274785
- Sepey, M., Manni, M., y Zdobnov, E. M. (2019). BUSCO: Assessing genome assembly and annotation completeness. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1962, 227–245. doi:10.1007/978-1-4939-9173-0\_14
- Serrano, S. M., y Maroun, R. C. (2005). Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*, 45(8), 1115–1132. doi:10.1016/j.toxicon.2005.02.020
- Shibata, H., Chijiwa, T., Oda-Ueda, N., Nakamura, H., Yamaguchi, K., Hattori, S., Matsubara, K., Matsuda, Y., Yamashita, A., Isomoto, A., Mori, K., Tashiro, K., Kuhara, S., Yamasaki, S., Fujie, M., Goto, H., Koyanagi, R., Takeuchi, T., Fukumaki, Y., Ohno, M., Shoguchi, E., Hisata, K., Satoh, N., Ogawa, T. (2018). The habu genome reveals accelerated evolution of venom protein genes. *Scientific reports*, 8(1), 11300. doi:10.1038/s41598-018-28749-4
- Six, D. A., y Dennis, E. A. (2000). The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochimica et biophysica acta*, 1488(1-2), 1–19. doi:10.1016/s1388-1981(00)00105-0
- Tasoulis, T., Lee, M. S. Y., Ziajko, M., Dunstan, N., Sumner, J., y Isbister, G. K. (2020). Activity of two key toxin groups in Australian elapid venoms show a strong correlation to phylogeny but not to diet. *BMC Evolutionary Biology*, 20(1). doi:10.1186/s12862-020-1578-x

- Teixeira, C. F., Landucci, E. C., Antunes, E., Chacur, M., y Cury, Y. (2003). Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. *Toxicon*, 42(8), 947–962. doi:10.1016/j.toxicon.2003.11.006
- Terrat, Y., Sunagar, K., Fry, B. G., Jackson, T. N., Scheib, H., Fourmy, R., Verdenaud, M., Blanchet, G., Antunes, A., y Ducancel, F. (2013). *Atractaspis aterrima* toxins: The first insight into the molecular evolution of venom in side-stabbers. *Toxins*, 5, 1948–1964.
- Tonello, F., y Rigoni, M. (2017). Cellular Mechanisms of Action of Snake Phospholipase A2 Toxins. *Snake Venoms*, 49–65. doi:10.1007/978-94-007-6410-1\_26
- Torres-Bonilla, K. A., Andrade-Silva, D., Serrano, S., y Hyslop, S. (2018). Biochemical characterization of venom from *Pseudoboa newwiedii* (Neuwied's false boa; Xenodontinae; Pseudoboini). *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP*, 213, 27–38. doi:10.1016/j.cbpc.2018.06.003
- Torres-Bonilla, K. A., Floriano, R. S., Schezaro-Ramos, R., Rodrigues-Simioni, L., y da Cruz-Höfling, M. A. (2017). A survey on some biochemical and pharmacological activities of venom from two Colombian colubrid snakes, *Erythrolamprus bizona* (Double-banded coral snake mimic) and *Pseudoboa newwiedii* (Neuwied's false boa). *Toxicon*, 131, 29–36. doi:10.1016/j.toxicon.2017.02.030
- Torres-Bonilla, K. A., Schezaro-Ramos, R., Floriano, R. S., Rodrigues-Simioni, L., Bernal-Bautista, M. H., y Alice da Cruz-Höfling, M. (2016). Biological activities of *Leptodeira annulata* (banded cat-eyed snake) venom on vertebrate neuromuscular preparations. *Toxicon*, 119, 345–351. doi:10.1016/j.toxicon.2016.07.004
- Tsetlin, V. (1999). Snake venom alpha-neurotoxins and other “three-finger” proteins. *European journal of biochemistry*, 264(2), 281–86. doi:10.1046/j.1432-1327.1999.00623

- Uetz, P. (2010). The original descriptions of reptiles. *Zootaxa*, 2334(1), 59–68. doi:10.11646/zootaxa.2334.1.3
- Ullah, A., Souza, T. A., Zanphorlin, L. M., Mariutti, R. B., Santana, V. S., Murakami, M. T., y Arni, R. K. (2013). Crystal structure of Jararacussin-I: the highly negatively charged catalytic interface contributes to macromolecular selectivity in snake venom thrombin-like enzymes. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 22(1), 128–132. doi:10.1002/pro.2189
- Usami, Y., Fujimura, Y., Suzuki, M., Ozeki, Y., Nishio, K., Fukui, H., y Titani, K. (1993). Primary structure of two-chain botrocetin, a von Willebrand factor modulator purified from the venom of *Bothrops jararaca*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(3), 928–932. doi:10.1073/pnas.90.3.928
- Viala, V. L., Hildebrand, D., Trusch, M., Fucase, T. M., Sciani, J. M., Pimenta, D. C., Arni, R. K., Schlüter, H., Betzel, C., Mirtschin, P., et al. (2015) Venomics of the Australian eastern brown snake (*Pseudonaja textilis*): Detection of new venom proteins and splicing variants. *Toxicon*, 107, 252–265.
- Vidal, N., Delmas, A. S., David, P., Cruaud, C., Couloux, A., y Hedges, S. B. (2007). The phylogeny and classification of caenophidian snakes inferred from seven nuclear protein-coding genes. *Comptes rendus biologiques*, 330(2), 182–187. doi:10.1016/j.crv.2006.10.001
- Vonk, F. J., Jackson, K., Doley, R., Madaras, F., Mirtschin, P. J., y Vidal, N. (2011). Snake venom: From fieldwork to the clinic. *BioEssays*, 33(4), 269–279. doi:10.1002/bies.201000117
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., y Schwede, T. (2018). SWISS-

- MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296–W303. doi:10.1093/nar/gky427
- Weinstein, S. A., Smith, T. L., y Kardong, K. V. (2009) Reptile venom glands. Form, function, and future. In *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*; Mackessy, S.P., Ed.; CRC Press/Taylor y Francis Group: Boca Raton, FL, USA, pp. 65–91.
- Weinstein, S. A., y Kardong, K. V. (1994). Properties of duvernoy's secretions from opisthoglyphous and aglyphous colubrid snakes. *Toxicon*, 32(10), 1161–1185. doi:10.1016/0041-0101(94)90347-6
- Zaher, H., Murphy, R. W., Arredondo, J. C., Graboski, R., Machado-Filho, P. R., Mahlow, K., Montingelli, G. G., Quadros, A. B., Orlov, N. L., Wilkinson, M., Zhang, Y. P., y Graziotin, F. G. (2019). Large-scale molecular phylogeny, morphology, divergence-time estimation, and the fossil record of advanced caenophidian snakes (Squamata: Serpentes). *PloS one*, 14(5), e0216148. doi:10.1371/journal.pone.0216148
- Zancolli, G., Calvete, J. J., Cardwell, M. D., Greene, H. W., Hayes, W. K., Hegarty, M. J., Herrmann, H. W., Holycross, A. T., Lannutti, D. I., Mulley, J. F., Sanz, L., Travis, Z. D., Whorley, J. R., Wüster, C. E., y Wüster, W. (2019). When one phenotype is not enough: divergent evolutionary trajectories govern venom variation in a widespread rattlesnake species. *Proceedings. Biological sciences*, 286(1898), 20182735. doi:10.1098/rspb.2018.2735
- Zhang J., Kobert K., Flouri T., y Stamatakis A. (2014). PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics*, 30, 614–620.
- Zhi, H., Qu, L., Wu, F., Chen, L., y Tao, J. (2015). Group IIE secretory phospholipase A2 regulates lipolysis in adipocytes. *Obesity*, 23(4), 760–768. doi:10.1002/oby.21015

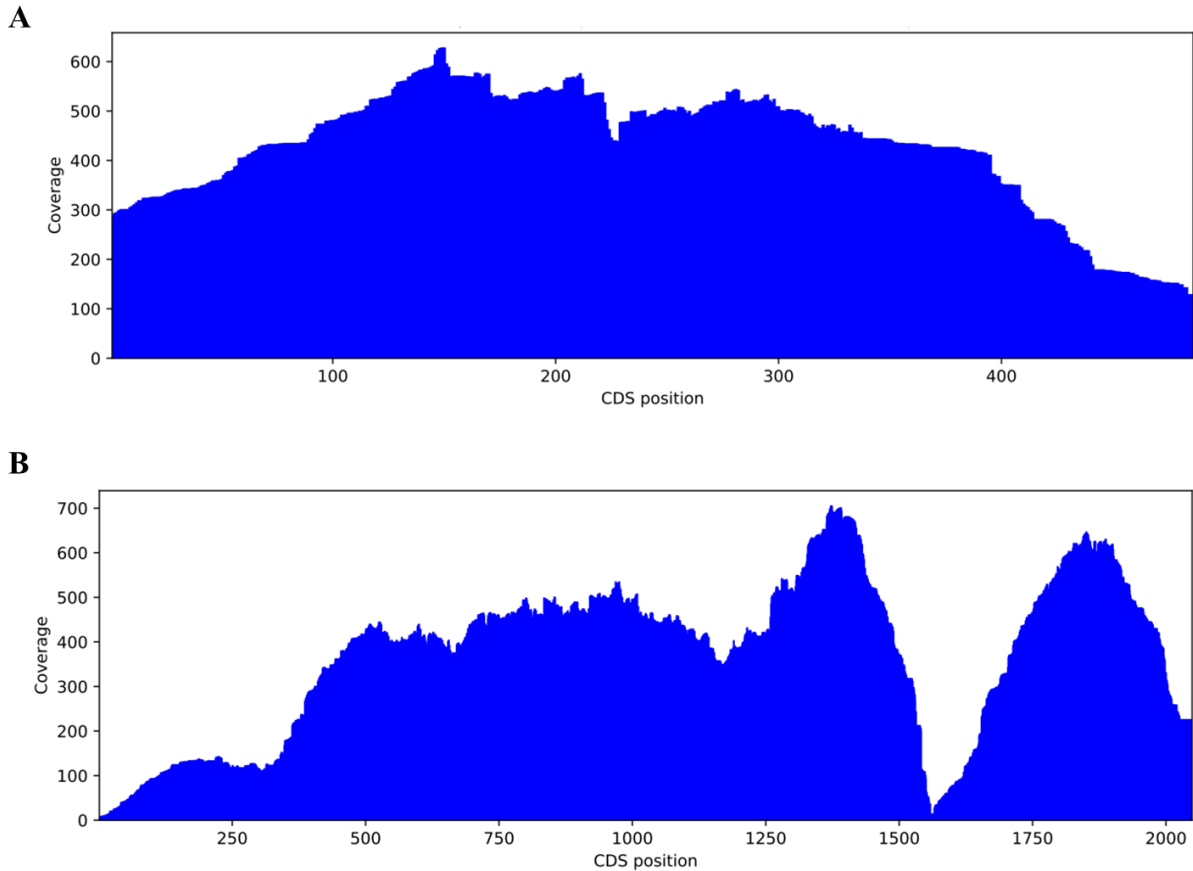
Zingali, R. B., Jandrot-Perrus, M., Guillin, M. C., y Bon, C. (1993). Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: characterization and mechanism of thrombin inhibition. *Biochemistry*, 32(40), 10794–10802. doi:10.1021/bi00091a034

## Apéndices

## Apéndice A. Datos de los Individuos

Individuos	Familia	Tribu	Género	Especie	Sexo	País	Estado	Municipio	Localidad
1	Dipsadidae	Xenodontini	<i>Xenodon</i>	<i>guentheri</i>	—	Brasil	Santa Catarina	Bom Retiro	RPPN Grande Floresta das Araucárias
2	Dipsadidae	Xenodontini	<i>Xenodon</i>	<i>guentheri</i>	—	Brasil	Santa Catarina	Bom Retiro	RPPN Grande Floresta das Araucárias
3	Dipsadidae	Xenodontini	<i>Xenodon</i>	<i>guentheri</i>	—	Brasil	Santa Catarina	Bom Retiro	RPPN Grande Floresta das Araucárias
1	Dipsadidae	Pseudoboini	<i>Pseudoboa</i>	<i>nigra</i>	—	Brasil	Bahía	Ipupiara	Chapada Diamantina
2	Dipsadidae	Pseudoboini	<i>Pseudoboa</i>	<i>nigra</i>	Femenino	Brasil	Rio de Janeiro	São João da Barra	RPPN Caruara
3	Dipsadidae	Pseudoboini	<i>Pseudoboa</i>	<i>nigra</i>	Masculino	Brasil	Rio de Janeiro	São João da Barra	RPPN Caruara

## Apéndice B. Perfiles de cobertura



*Nota.* **A.** Perfil de cobertura bueno. En este perfil de cobertura se puede apreciar que cada una de las posiciones de un determinado transcrito tiene un mapeo relativamente homogéneo de las lecturas. Por el contrario, en un **B.** Perfil de cobertura malo se puede apreciar una disminución abrupta del mapeo de lecturas en una posición determinada; este fenómeno se da por errores de ensamblaje. Estos errores ocurren por lo general cuando un ensamblador une regiones de dos proteínas diferentes.